

**Mit der Nichtenzymatischen Templatgesteuerten  
Oligomerisierung von RNA zu  
Selektionsexperimenten**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische  
Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Marcus Hey  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main  
2004  
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. H. Schwalbe
1. Gutachter:	Prof. Dr. M. W. Göbel
2. Gutachter:	Prof. Dr. J. W. Engels
Datum der Disputation:	22.07.2004

***Für meine Eltern***

## Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis Januar 2004 am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel danke ich besonders für die interessante und spannende Aufgabenstellung, für die hervorragende Betreuung und für zahlreiche Anregungen und Hilfestellungen.

Mein Dank gilt auch dem Team um Herrn Dr. G. Zimmermann für die Durchführung der NMR-spektroskopischen Messungen, Frau M. Christof für die Anfertigung der Elementaranalysen und Frau I. Priess und Frau H. Brill für die Messung der Massenspektren. Der HPLC-Abteilung unter der Leitung von Dr. G. Dürner und seinen Mitarbeiterinnen möchte ich für die Analyse und Aufreinigung vieler Proben danken. Herrn G. Dürner gilt mein Dank insbesondere für seine Ratschläge bei chromatographischen Problemen. Bei Frau Dr. U. Scheffer und Mitarbeiterinnen bedanke ich mich für die Unterstützung bei allem, was mit der Analytik von Nucleinsäuren zu tun hatte.

Meinen Laborkollegen aus Frankfurt möchte ich für die stets angenehme Laboratmosphäre und sehr gute Zusammenarbeit danken. Namentlich besonders erwähnen möchte ich Oliver Boden, Arne Büsing, Christian Hartel, Andreas Krebs, Verena Ludwig, Zarghun Nazir, Sascha Peter und Christoph Timm. Sie alle haben durch ihr kollegiales Verhalten, durch ihre stete Hilfsbereitschaft und durch zahlreiche Diskussionen für eine schöne Zeit gesorgt.

# Inhalt

<b>Vorwort</b>	<b>IV</b>
<b>Inhalt</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 RNA-Welt und nichtenzymatische Oligomerisierung</b>	<b>3</b>
2.1 RNA-Welt	3
2.2 Nichtenzymatische Oligomerisierung	14
<b>3 RNA-Synthese</b>	<b>31</b>
3.1 Synthese der Monomere	32
3.2 Synthese der Oligonucleotide	34
<b>4 Oligomerisierungsexperimente</b>	<b>35</b>
4.1 Ausgangssituation	36
4.2 Experimente im Rahmen dieser Dissertation	37
4.2.1 Untersuchungen zur kritischen Länge des Templats	38
4.2.1.1 Einbau von G	39
4.2.1.2 Einbau von C	41
4.2.1.3 Einbau von G und C	43
4.2.1.4 Einbau von G und D	45
4.2.2 Vergleich A und D in Templaten und als aktivierte Imidazolide	47
4.2.2.1 D und A als Monomere	48
4.2.2.2 D und A im Templat	49
4.2.3 Einbau gegenüber random-Sequenzen	50
4.2.3.1 Einbau gegenüber [C/T]-Zufallspositionen	50
4.2.3.2 Einbau gegenüber [A/C/G/T]-Zufallspositionen	51
4.2.4 Vergleich von DNA- und RNA- „GCACG“ Primer	52
4.2.5 Suche nach einem orthogonalem Primerpaar für die nichtenzymatische PCR	53
4.2.5.1 „CCUUC“ Primer 15	57
4.2.5.2 „CUCCCC“ Primer 16	60
4.2.5.3 „CCGCC“ Primer 13	61
4.2.5.4 „CCCCC“ Primer 12	63
4.2.5.5 „CCCCCG“ Primer 17	66

4.2.5.6	„CCUCC“ Primer <sup>21</sup> mit verkürztem Spacer	69
4.2.6	Zwei verschiedene Primer	71
4.2.7	Isolierung der Verlängerungsprodukte	74
4.2.8	Die Rückreaktion	76
4.2.9	Hydrolyse und HPLC Analytik	78
4.2.9.1	Analyse des Einbaus von G und D	80
4.2.9.2	Analyse des Einbaus gegenüber drei Zufallspositionen	82
<b>5</b>	<b>Weitere Experimente</b>	<b>83</b>
5.1	Versuche zur Synthese fluoreszenzmarkierter Oligonucleotide	83
5.1.1	Synthese des Fluoreszenzfarbstoffs	83
5.1.2	Synthese schwefelhaltiger Guanosinmonophosphate	86
5.2	Hydrolyseexperimente zur Untersuchung der Stabilität der 2',5'- Bindung im Vergleich zur 3',5'-Bindung	88
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>97</b>
7.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen	97
7.2	Synthese der Monomere	100
7.2.1	Adenosin-Phosphoramidit	100
7.2.1.1	Synthese von 2-N-Benzoyladenosen <u>38</u>	100
7.2.1.2	Synthese von 2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-adenosin <u>39</u>	101
7.2.1.3	Silylierung von 2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- adenosin <u>39</u> mit TBDMS-Cl	102
7.2.1.4	Silylierung von 2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- adenosin <u>39</u> mit TIPS-Cl	105
7.2.1.5	Synthese von 2-N-Benzoyl-3'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)- 5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl- adenosin <u>45</u>	107
7.2.1.6	Synthese von 2-N-Benzoyl-2'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)- 5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl- adenosin <u>46</u>	109
7.2.2	Synthese des Cytidin-Phosphoramidits	110
7.2.2.1	Acetylierung zu 4-N-Acetyl-cytidin <u>48</u>	110
7.2.2.2	Synthese von 4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-cytidin <u>49</u>	111
7.2.2.3	Silylierung von 4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-cytidin <u>49</u> mit TBDMS-Cl	113

7.2.2.4	Silylierung von 4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-cytidin <u>49</u> mit TIPS-Cl	115
7.2.2.5	Synthese von 4-N-Acetyl-3'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropyl-cytidin <u>55</u>	117
7.2.3	Synthese des Guanosin-Phosphoramidits	119
7.2.3.1	Herstellung von 2-N-Dimethylformamidino-guanosin <u>56</u>	119
7.2.3.2	Tritylierung zu 2-N-Dimethylformamidino-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-guanosin <u>57</u>	120
7.2.3.3	Einführung der TBDMS-Schutzgruppe an 2-N-Dimethylformamidino-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-guanosin <u>57</u>	121
7.2.3.4	Silylierung von 2-N-Dimethylformamidino-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-guanosin <u>57</u> mit TIPS-Cl	123
7.2.3.5	Synthese von 2-N-Dimethylformamidino-3'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl-guanosin <u>63</u>	126
7.2.3.6	Synthese von 2-N-Dimethylformamidino-2'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyl-guanosin <u>64</u>	127
7.2.4	Synthese des Uridin-Phosphoramidits	129
7.2.4.1	Tritylierung zu 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-uridin <u>66</u>	129
7.2.4.2	Silylierung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-uridin <u>66</u> mit TBDMS-Cl	130
7.2.4.3	Synthese von 3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-uridin <u>69</u>	132
7.2.4.4	Darstellung von 2'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-uridin <u>70</u>	134
7.2.5	Synthese des Diaminopurinphosphoramidits	135
7.2.5.1	Darstellung von 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-guanosin <u>71</u>	135
7.2.5.2	Synthese von 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-amino-6-chloropurin <u>72</u>	136
7.2.5.3	Darstellung von 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-amino-6-azidopurin <u>73</u>	138
7.2.5.4	Hydrierung des Azids <u>73</u> zu 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin <u>74</u>	139
7.2.5.5	Synthese von 9-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin <u>75</u>	140
7.2.5.6	Benzoylierung zu 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,2-N,6-N,6-N-tetrabenzoyl-2,6-diaminopurin <u>76</u>	141

7.2.5.7	Partielle Entschützung zu 9-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)-2N,6N-2,6-dibenzoyl-diaminopurin <u>77</u>	142
7.2.5.8	Tritylierung zu 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2N,6N-dibenzoyl-2,6-diaminopurin <u>78</u>	143
7.2.5.9	Silylierung von 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2N,6N-dibenzoyl-2,6-diaminopurin <u>78</u> mit TIPS-Cl	144
7.2.5.10	Synthese des 9-(3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2N,6N-dibenzoyl-2,6-diaminopurin <u>81</u>	146
7.2.5.11	Acetylierung von Tri-O-Ac-Diaminopurin <u>74</u> zu 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin <u>82</u>	148
7.2.5.12	Selektive Entschützung zu 9-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin <u>83</u>	149
7.2.5.13	Tritylierung zu 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxy triphenylmethyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin <u>84</u>	150
7.2.5.14	Einführung der TIPS-Schutzgruppe an 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxy triphenylmethyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin <u>84</u>	152
7.2.5.15	Synthese des 9-(3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2N,6N-diacetyl-2,6-diaminopurin <u>87</u>	154
7.2.6	Synthese der Phosphorimidazolide	155
7.2.6.1	Darstellung von Adenosin-5'-[Na <sup>+</sup> /Li <sup>+</sup> -(2-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na <sup>+</sup> ]/[Li <sup>+</sup> ] <u>89</u>	155
7.2.6.2	Darstellung von Cytidin-5'-[Na <sup>+</sup> /Li <sup>+</sup> -(2-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na <sup>+</sup> ]/[Li <sup>+</sup> ] <u>91</u>	157
7.2.6.3	Darstellung von Guanosin-[Na <sup>+</sup> /Li <sup>+</sup> -(2-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na <sup>+</sup> ]/[Li <sup>+</sup> ] <u>3</u>	159
7.2.6.4	Darstellung von Uridin-[Na <sup>+</sup> /Li <sup>+</sup> -(2-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na <sup>+</sup> ]/[Li <sup>+</sup> ] <u>94</u>	160
7.2.6.5	Synthese von 2',3'-O-Isopropyliden-9-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin <u>95</u>	162
7.2.6.6	Phosphorylierung zu 9-( $\beta$ -D-ribofuranosyl-5'-phosphorsäure)-2,6-diaminopurin <u>96</u>	163
7.2.6.7	Synthese von 9-([Na <sup>+</sup> /Li <sup>+</sup> -(2-Methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-phosphonat]- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin [Na <sup>+</sup> ]/[Li <sup>+</sup> ] <u>97</u>	164
7.2.6.8	Synthese von 2',3'-O-Isopropyliden-iso-guanosin <u>99</u>	166
7.2.6.9	Synthese von iso-Guanosin-5'-Phosphorsäure <u>100</u>	167



7.2.6.10	Umsetzung zu iso-Guanosin-[Na <sup>+</sup> /Li <sup>+</sup> -(2-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-phosphonat] [ <u>Na<sup>+</sup></u> ]- <u>101</u>	168
<b>7.2.7</b>	<b>Synthese von Guanosin-5'-thiophosphat</b>	<b>169</b>
7.2.7.1	Synthese von 2',3'-O-Isopropyliden-guanosin <u>32</u>	169
7.2.7.2	Iodierung zu 2',3'-O-Isopropyliden-5'-deoxy-5'-iodo-guanosin <u>34</u>	170
7.2.7.3	Synthese von 5'-Deoxy-5'-iodo-guanosin <u>35</u>	171
7.2.7.4	Darstellung von 5'-Deoxy-5'-thioguanosin-5'-monophosphat <u>31</u>	172
7.2.7.5	Synthese des Guanosin-5'-O-monophosphorthioat GMPS <u>36</u>	173
<b>7.2.8</b>	<b>Synthese von Cy5-Phosphoramidit</b>	<b>174</b>
7.2.8.1	Herstellung von 3-Iod-propyl-acetat <u>8</u>	174
7.2.8.2	Alkylierung von 2,3,3-Trimethylindolenin zu 1((3'(1'-Acetoxypropyl))-2,3,3-trimethyl-(3 <i>H</i> )-indolinium Iodid <u>10</u>	175
7.2.8.3	Synthese von 1,1'-Bis-Acetoxypropyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin Iodid <u>12</u>	176
7.2.8.4	Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen zu 1,1'-Bis-(3''-(1''-hydroxypropyl))-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin <u>13</u>	177
7.2.8.5	Tritylierung zu 1-(3''''-(1''''Hydroxypropyl))-1'-(3''-(1''-dimethoxytriphenylmethyl)-oxypropyl))-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin Iodid <u>14</u>	178
7.2.8.6	Herstellung des Cy5-Phosphoramidits <u>15</u>	179
<b>7.2.9</b>	<b>Synthese von Cy5-Iodacetamid</b>	<b>180</b>
7.2.9.1	Synthese von 1,3,3-Trimethyl-2-methylen-5-N-phthalimidometylindolin <u>18</u>	180
7.2.9.2	Darstellung von 5-Aminomethyl-1,3,3-trimethyl-2-methylen-5-N-phthalimidometylindolin <u>19</u>	181
7.2.9.3	Umsetzung des Amins <u>19</u> zum 5-Chloracetamidomethyl-1,3,3-trimethyl-2-methylenindolenin <u>20</u>	182
7.2.9.4	Synthese von 2,3,3-Trimethyl-3 <i>H</i> -indole-5-sulfonsäure <u>23</u>	183
7.2.9.5	Umsetzung zum Kalium-Salz des 2,3,3-Trimethyl-3 <i>H</i> -indol-5-sulfonats <u>24</u>	184
7.2.9.6	Alkylierung des Indols <u>24</u> zu 2,3,3-Trimethyl-1-(3-sulfonatopropyl)-3 <i>H</i> -indolinium-5-sulfonat Kalium Salz <u>26</u>	185
7.2.9.7	Umsetzung mit Malonaldehyd-Dianilid zu 2-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i> ,)- $\alpha$ -Acetylphenylaminobuta-1,3-(3-sulfonatopropyl)-3 <i>H</i> -indolium-5-sulfonat <u>28</u>	186
7.2.9.8	Synthese des 2-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i> , 5 <i>E</i> )-5-(5-(Chloroacetylamino)-1,3,3-trimethyl-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-1-(3-sulfonatopropyl)-3 <i>H</i> -indolium-5-sulfonat Kalium Salz <u>29</u>	186

---

7.2.9.9	Umsetzung zum 2-[(1E,3E, 5E)-5-(5-(Iodoacetyl-amino)-1,3,3-trimethyl-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-1-(3-sulfonatopropyl)-3 <i>H</i> -indolium-5-sulfonat <u>30</u>	188
7.2.10	Synthese des Phospitylierungsreagenzes	189
7.2.10.1	Synthese von 2-Cyanethoxydichlorphosphin <u>103</u>	189
7.2.10.2	Synthese von Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorphosphin <u>104</u>	189
7.3	Oligonucleotidsynthese	191
7.3.1	Festphasensynthese	191
7.3.2	Aufarbeitung der Oligonucleotide	193
7.3.3	Quantifizierung der Oligonucleotide	194
7.3.4	Reinheitskontrolle der Oligonucleotide	195
7.3.5	Liste der verwendeten Oligonucleotide	195
7.4	Oligomerisierungsexperimente	199
7.4.1	Standard „GCACG“ Primer	201
7.4.1.1	Einbau von G	201
7.4.1.2	Einbau von C	205
7.4.1.3	Einbau von G und C	210
7.4.1.4	Einbau von G und D/A	212
7.4.1.5	Einbau von G und U	216
7.4.1.6	Einbau von drei unterschiedlichen Imidazoliden	218
7.4.1.7	Zufallseinbau	220
7.4.2	Standard „GCACG“ Primer aus DNA	225
7.4.2.1	Einbau von G	225
7.4.2.2	Einbau von G und A/D	227
7.4.2.3	Zufallseinbau	228
7.4.3	„CCUCC“ Primer	231
7.4.3.1	Einbau von G	231
7.4.3.2	Einbau von G und A/D	232
7.4.3.3	Einbau von drei Imidazoliden	233
7.4.3.4	Zufallseinbau	233
7.4.4	„CUCCCC“ Primer	235
7.4.4.1	Einbau von G	235
7.4.4.2	Einbau von G und A/D	236
7.4.4.3	Einbau von drei Imidazoliden	237
7.4.5	„CCGCC“ Primer	238
7.4.5.1	Einbau von G	238

---

7.4.5.2	Einbau von G und A/D	239
7.4.6	„CCCCC“ Primer	240
7.4.6.1	Einbau von G	240
7.4.6.2	Einbau von G und C	240
7.4.6.3	Einbau von G und A/D	241
7.4.6.4	Einbau von drei Imidazoliden	242
7.4.6.5	Zufallseinbau	242
7.4.7	„CCCCCG“ Primer	244
7.4.7.1	Einbau von C	244
7.4.7.2	Einbau von G und D	245
7.4.7.3	Zufallseinbau	246
7.4.8	„CCUCC“ Primer mit verkürztem Spacer	248
7.4.8.1	Einbau von G	248
7.4.8.2	Zufallseinbau	248
7.4.9	Zwei verschiedene Primer	250
7.4.10	Aufreinigung eines vollverlängerten Produkts	253
7.4.11	Rückreaktion	254
7.4.12	Hydrolyse, Dephosphorylierung und HPLC-Analytik	254
7.5	Hydrolyseexperimente nach Usher/McHale	257
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>260</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	260
8.2	Bezifferung der Nucleotide und Farbstoffe	264
8.3	Literatur	265
8.4	Index	271
8.5	Bildverzeichnis	273
8.6	Registriernummernverzeichnis	277
	Lebenslauf	279
	Publikationsliste	280
	Eidesstattliche Versicherung	281

# 1 Einleitung

Die Arbeiten in dieser Dissertation beschäftigen sich mit den Eigenschaften der Ribonucleinsäure RNA. Im Besonderen wurde die Fähigkeit untersucht, ob sich RNA auf nichtenzymatischem Weg verlängern lässt. Dazu wird ein Primer mit einem geeigneten Templat inkubiert. Durch die Zugabe aktivierter Mononucleotide soll die im Templat gespeicherte Information mittels Watson/Crick-Basenpaarung auf die neu gebildete RNA übertragen werden.

Die Forschung über RNA hat in letzter Zeit stark an Bedeutung gewonnen. Nach der Sequenzierung des menschlichen Erbguts richtet sich das Interesse nun auf die Genprodukte, wie z.B. auf die messenger RNA (mRNA) oder auf die Proteine. Die Entdeckung, dass RNA durch bestimmte, bis dahin unbekannte Funktionen in Regulation, Genexpression oder Stoffwechselvorgänge eingreifen kann, bekräftigt die Bedeutung von RNA. So wurden z.B. sog. small RNA's von *Science* 2002 zum Durchbruch des Jahres gekürt. Sie spielen besonders bei der RNA-Interference (RNAi) eine große Rolle. Bei diesem Vorgang werden doppelsträngige RNA's durch Dicer-Enzyme in kürzere Oligonucleotide mit einer Länge von etwa 21 Nucleotiden geschnitten. Diese können durch Duplexbildung den Abbau von mRNA's fördern und so zum Abschalten bestimmter Gene führen (Gene silencing).

Besondere Bedeutung besitzen die hier vorgestellten Arbeiten im Zusammenhang mit der Theorie der „RNA-Welt“. Sie beschäftigt sich im weitesten Sinn mit der Entstehung des Dogmas der Biochemie. Darin heißt es, dass DNA als Informationsspeicher dient. DNA wird durch den Vorgang der Replikation kopiert und vermehrt. Sie wird durch die Transkription in RNA umgeschrieben, diese wiederum dient als Vorlage zur Biosynthese der Proteine (Translation), die verschiedenste enzymatische Eigenschaften besitzen. Was stand aber am Anfang? Gab es zuerst Proteine, die die Oligomerisierung von Nucleinsäuren katalysierten, oder stand an erster Stelle RNA, in der die Information für die Proteine codiert war? In der „RNA-Welt“ versucht man darauf eine Antwort zu finden. In dieser Theorie wird RNA sowohl als

Informationsspeicher als auch als Katalysator für die eigene Vermehrung angesehen. Bevor RNA aber diese Selbstreplikation katalysieren kann, muss es einen Mechanismus gegeben haben, nach dem sich lange Nucleinsäuren aus einem Pool von Monomeren bildeten. Idealerweise soll dabei die Information von einem Elternstrang auf einen Tochterstrang verlustfrei übertragen werden. Es soll durch „Fehler“ beim Kopieren aber auch Raum für evolutive Prozesse bleiben. Mit dieser Fragestellung beschäftigt sich die „Nichtenzymatische Templatkontrollierte Oligomerisierung von RNA“. Neueste Erkenntnisse dazu sollen in dieser Dissertation dargestellt werden.

Diese Arbeit gliedert sich in die folgenden Abschnitte. In Kapitel 2 wird ausführlich auf die Theorie der RNA-Welt und im Speziellen auf die Nichtenzymatische Oligomerisierung eingegangen. Kapitel 3 beschreibt kurz die Synthese von RNA-Monomeren und –Oligomeren. In Kapitel 4 werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zur Primerverlängerung ausführlich vorgestellt. Zum Abschluss werden in Kapitel 5 weitere Untersuchungen beschrieben, die sich mit der Farbstoffmarkierung von RNA und ihrer Hydrolyseempfindlichkeit beschäftigen. Kapitel 6 schließlich fasst die Resultate noch einmal zusammen und gibt einen Ausblick auf weiterführende Experimente.

## **2 RNA-Welt und nichtenzymatische Oligomerisierung**

### **2.1 RNA-Welt**

Wie entwickelten sich auf der Erde aus unbelebter Materie die heute bekannten Lebensformen? Das ist eine Frage, die sich Forscher schon seit vielen Jahren stellen. Eine eindeutige Antwort darauf wird sich zwar nie finden lassen. Dennoch gibt es Theorien, die zu aussagekräftigen Experimenten führen, woraus sich mögliche Szenarien entwickeln lassen.

Eine Richtung dieser Forschung ist geprägt durch den Begriff der präbiotischen Chemie. Ihr Inhalt besteht u. a. darin, einfache Molekülsysteme zu finden, die die Fähigkeit zur Selbstreproduktion und zur Evolution besitzen. Denn das sind zwei wichtige Grundlagen für ein Phänomen, das als „Leben“ bezeichnet wird.

In den letzten Jahren wurde der Begriff „RNA-Welt“ als Theorie zur präbiotischen Entstehung des Lebens in der Literatur häufig thematisiert [1],[2],[3]. Die zentrale Rolle darin spielt die Nucleinsäure RNA. Sie wird auf der einen Seite durch ihre Basenabfolge als Informationsträger gesehen. Anders als DNA kann RNA aber auch unterschiedlichste Sekundärstrukturen bilden. Die dadurch gewonnene Fähigkeit, bestimmte Funktionen auszuüben, kann es ihr u.a. ermöglichen, den eigenen Kopiervorgang zu katalysieren und so eine Grundlage zu einer evolutiven Entwicklung zu bilden. Nach der „RNA-Welt-Hypothese“ trat erst später eine Differenzierung auf, es entwickelten sich Proteine, welche als Enzyme die katalytischen Aufgaben übernahmen, und DNA, die als Informationsspeicher als Träger der Erbinformation dienen [4],[5].

Durch die Arbeiten von T. R. Cech [6] und S. Altman [7], in denen erste katalytisch wirksame RNA-Moleküle, die Ribozyme, beschrieben wurden, konnte die Theorie bekräftigt werden. In den folgenden Jahren wurden weitere

Ribozyme mit neuen katalytischen Eigenschaften entdeckt. J. W. Szostak berichtete 1991 über eine templatgesteuerte Verlängerung eines Primers durch Dinucleotide, die von dem *Tetrahymena* Ribozym katalysiert wurde [8]. Einem Modell für eine RNA-katalysierte Replikation von RNA kam er durch die Verwendung von Triphosphaten als Substrat sehr nah [9],[10]<sup>1</sup>. 1998 wurde von D. P. Bartel eine RNA-katalysierte Synthese von Nucleotiden publiziert [13]. G. F. Joyce konnte 2002 zeigen, dass auch ein Ribozym, das nur aus zwei unterschiedlichen Nucleotiden besteht, katalytische Eigenschaften besitzen kann [14].

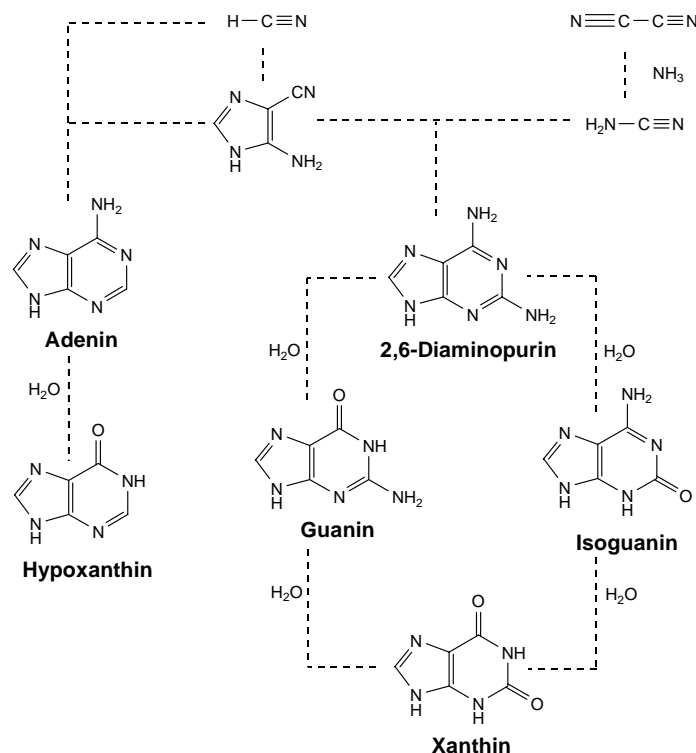


Bild 1: Mögliche Bildung der Purin-Basen aus Blausäure und Dicyan [19]

Ein weiteres Indiz, das ein RNA-Welt-Szenario unterstützt, ist die Entdeckung von H. F. Noller. Er zeigte, dass in den Ribosomen, der Ort wo die Proteinbiosynthese stattfindet, nicht der Proteinbestandteil die Bildung der Peptidbindungen katalysiert, sondern der Nucleinsäureanteil [15]. Szostak konnte das später durch weitere experimentelle Beweise bestätigen.

<sup>1</sup> Für eine Übersicht über RNA-Replikation katalysiert durch RNA siehe [11],[12].

Ein weiterer Hinweis auf eine „RNA-Welt“ besteht darin, dass in allen lebenden Organismen die 2'-Desoxynucleotide erst durch Ribonucleotid-Reduktasen aus den Ribonucleotiden gebildet werden [16].

Gibt es in der RNA-Welt eine Möglichkeit, die präbiotische Synthese der Monomere und ihre Kondensation zu Oligomeren zu beschreiben? Das versucht die präbiotische Chemie zu erklären. Der Beginn dieses Arbeitsgebiets ist in der Arbeit von S. L. Miller zu sehen. In einer Versuchsanordnung, mit der die Bedingungen auf einer Erde vor mehreren Milliarden Jahren simuliert werden sollte, schickte Miller elektrische Entladungen in eine Atmosphäre aus Methan, Ammoniak, Wasserstoff und Wasser. Unter der Vielzahl der entstandenen Produkten ließen sich u. a. einige Aminosäuren finden [17]. Das zeigte, wie aus einfachen Edukten, komplexe Moleküle entstehen können.

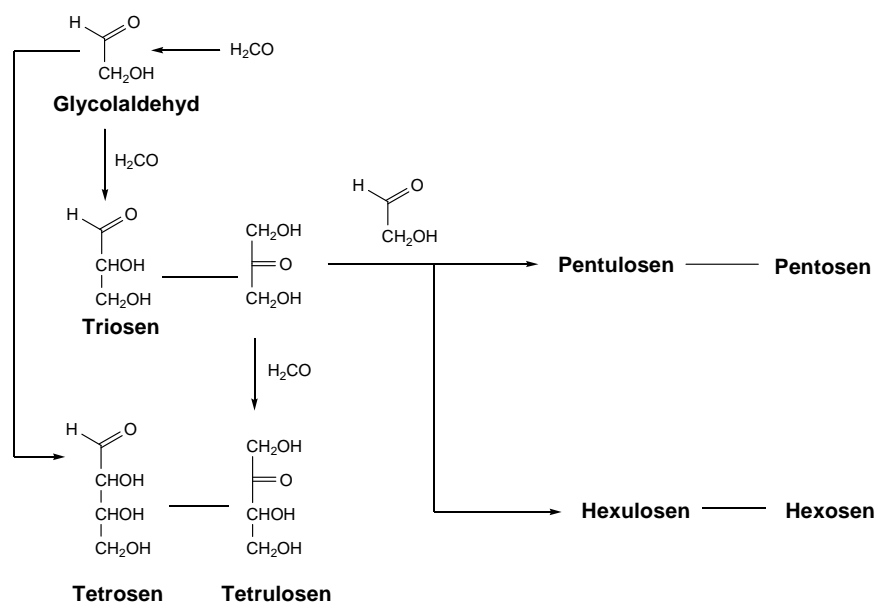


Bild 2: Formose-Reaktion nach [20]

Versuche von J. Oro zeigten, wie sich Purin-Basen aus einfachen Molekülen wie Blausäure oder Dicyan, die in einer präbiotischen Welt vorhanden gewesen sein könnten, aufbauen ließen [18]. A. Eschenmoser fasste diese präbiotische Bildung der Basen in einer seiner Arbeiten zusammen (Bild 1) [19]. Zur Zeit gibt es aber noch keine Arbeiten, die über eine potentielle Bildung von Pyrimidinen aus einfachen Vorläufern berichten.



Auch die präbiotische Bildung der Zuckerbausteine ist denkbar. So lassen sich durch die Formose-Reaktion aus dem einfachen Vorläufer Formaldehyd verschiedenste Kohlehydrate darstellen (Bild 2) [20]. Ein Nachteil dieser Reaktion aus der Sicht der präbiotischen Chemie ist allerdings ihre geringe Selektivität. Der wichtige Baustein Ribose entsteht nur in sehr geringen Ausbeuten. Einen besseren Vorschlag lieferte eine Arbeit von Eschenmoser [21]. Hier wurde gezeigt, dass die Aldolisierung von Glycoaldehydphosphat **1** in Gegenwart von Formaldehyd in aq. NaOH zur Bildung von Pentose-2,4-diphosphaten und Hexose-2,4,6-triphosphaten führte. Zu einem großen Anteil wurde racemisches Ribose-2,4-Diphosphat **2** gebildet (Bild 3).

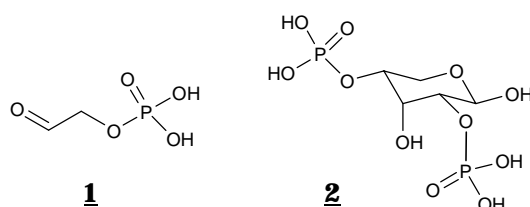


Bild 3: Glycoaldehyd-phosphat **1** und Ribose-2,4-diphosphat **2** [21]

Warum bei den natürlichen Nucleinsäuren aber nur aus Ribose und 2'-Desoxyribose aus der Vielzahl der möglichen Zucker selektiert wurden, versuchten Eschenmoser und Mitarbeiter durch den Aufbau von Nucleinsäuren mit einem modifiziertem Zuckerrückgrat zu klären.

Unter dem Aspekt der Konformationsanalyse mit der Frage „Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren?“ wurden in der Gruppe von Eschenmoser zwei neuartige Nucleinsäuren entwickelt, die Hexose-Nucleinsäure Homo-DNA [19] und die Pyranosyl-Nucleinsäure p-RNA [22] (Bild 4).

Die Zucker der Homo-DNA dürften in einer präbiotischen Welt allerdings keine Rolle gespielt haben, da sie keine Produkte der Formose-Reaktion bzw. der Aldolreaktion sind. Die Homo-DNA diente aber als Modell, um ihre Konformation und ihre Paarungseigenschaften im Vergleich zur DNA zu untersuchen. Man erhoffte sich dadurch erklären zu können, warum Fünfringe den Vorzug gegenüber Sechsringen gefunden haben.

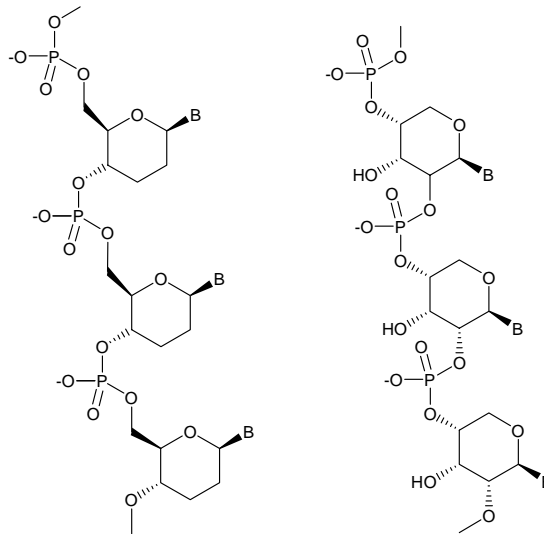


Bild 4: Homo-DNA (links) und p-RNA (rechts)

Homo-DNA setzt sich aus 2',3'-Dideoxyglucopyranosyl-Monomeren zusammen [23]. Der Unterschied zur DNA besteht nur aus einer zusätzlichen  $\text{CH}_2$ -Gruppe im Zuckerring (Bild 4). An ihr ließ sich die grundlegende Wichtigkeit des fünfgliedrigen Zuckerrings beurteilen. Es stellte sich heraus, dass ein idealisierter Homo-DNA-Einzelstrang, um paarungsfähig zu sein, linear aufgebaut sein muss. DNA hingegen liegt schon als Einzelstrang helical vor [24]. Homo-DNA bildet untereinander mit stabilen Purin/Pyrimidin-Basenpaaren Doppelhelices aus, kann sich aber nicht mit DNA paaren. Es ist bei Homo-DNA Duplexen sehr auffällig, dass sich zusätzlich zu den Watson/Crick-Basenpaaren auch die Purin/Purin-Basenpaare wie A/A und G/G mit großer Stabilität bilden [25]. Diese Besonderheit war Gegenstand weiterer Untersuchungen. Man betrachtete zusätzlich die nichtnatürlichen Basen Isoguanin isoG, 2,6-Diaminopurin D und Xanthin X. Dabei stellte sich heraus, dass G mit isoG und D mit X Basenpaarungen nach Watson/Crick eingehen. Genau wie A und G bilden sich auch mit isoG und D reverse Hoogsteen-Bindungen (Bild 5) [26]. Aus dieser Purin/Purin-Selbstpaarung schloss man, dass die Paarungseigenschaften und die Selektivität der Watson/Crick-Basenpaarung nicht nur auf den Strukturen der Basen, sondern auch auf der Natur der Zuckerphosphat-Kette beruhen [25].

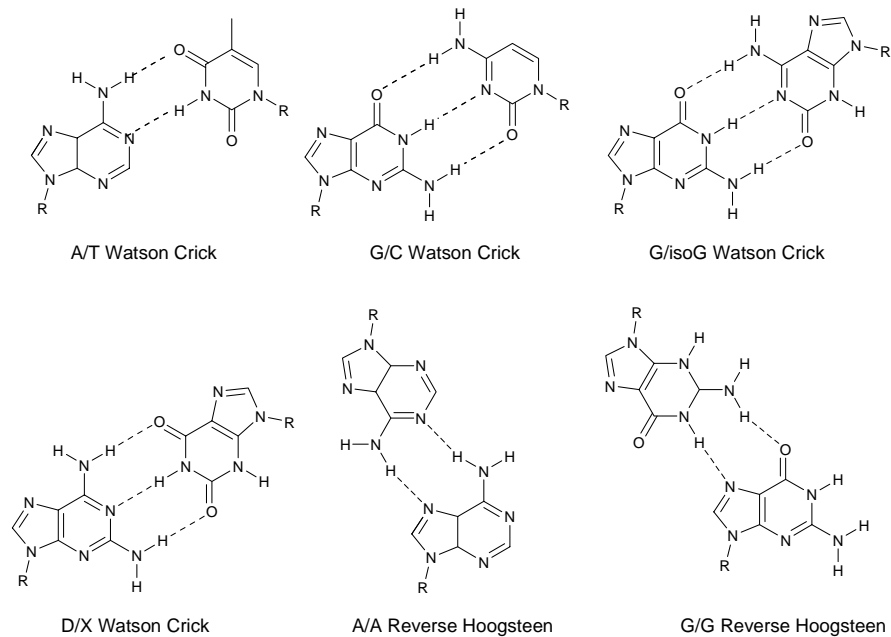


Bild 5: einige Basenpaarungen bei Homo-DNA [26]

Die Nucleinsäure p-RNA ist das Ribopyranosyl-Isomer der natürlichen RNA<sup>2</sup>. Sie bildet stabile Duplexe untereinander, aber nicht mit RNA. Da p-RNA ein Produkt der Aldolreaktion ist, könnte sie in einer prä-RNA-Welt eine Rolle gespielt haben. An p-RNA wurde die gleiche Konformationsanalyse durchgeführt wie an Homo-DNA. Es wurde erwartet, dass Duplexe aus p-RNA linear vorliegen und starke Purin/Pyrimidin-Paarung aufweisen, wie es auch schon bei der Homo-DNA festgestellt wurde. Tatsächlich fand man heraus, dass z.B. das A/U-Basenpaar in p-RNA stabiler war als in RNA. Eine Paarung aus Purinen wie bei der Homo-DNA trat bei der p-RNA nicht auf. Diese beiden Ergebnisse wurden mit einem rigideren Rückgrat erklärt. p-RNA besitzt nur vier flexible Bindungen im Gegensatz zu DNA mit sechs Bindungen. Außerdem sind die Basen zur Rückgrat-Achse stark geneigt, was eine effektive Stapelwechselwirkung der Basen erleichtert. p-RNA ist demnach im Hinblick auf eine Watson-Crick Paarung sehr selektiv, was für fehlerfreie Übertragung von Information äußerst wichtig ist [22],[27].

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde untersucht, ob p-RNA die Fähigkeit zu einer templatkontrollierten Replikation besitzt. Es stellte sich heraus, dass

guanosinreiche Oligomere aus p-RNA wenig zur Bildung von Quadrupelsträngen neigen. Ein p-RNA-G<sub>8</sub> konnte somit als Templat für die Verknüpfung zweier p-RNA-C<sub>4</sub>-Bausteine dienen. Nach der Aktivierung mit EDC, wobei sich das 2',3'-Cyclophosphat bildete, ligierten sie zu dem p-RNA-C<sub>8</sub>-Oligomer. Auch die Rückreaktion, die Verknüpfung von zwei p-RNA-G<sub>4</sub> an dem p-RNA C<sub>8</sub>-Templat, verlief erfolgreich [27] (Bild 6).

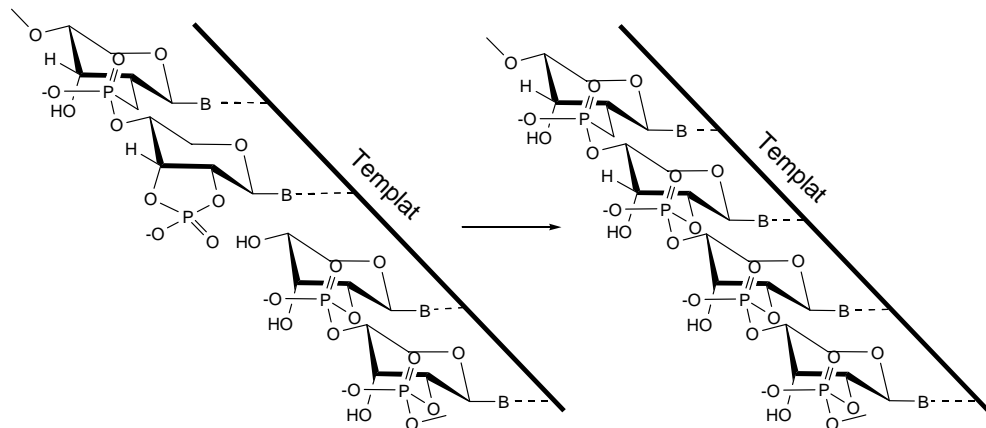


Bild 6: Chemische Ligation über ein Cyclophosphat

Später gelang die Bildung des Octamers  $\text{pr}(4'\text{GCCCCGCC}^2)$  durch Ligation aus zwei Molekülen  $\text{pr}(4'\text{GCCC})$ -2',3'-Cyclophosphat an dem komplementären Templat  $\text{pr}(4'\text{GGGCGGGC}^2)^3$ . Die neu gebildete Bindung bestand ausschließlich aus einer 2',4'-Phosphodiester-Bindung und entsprach somit der für p-RNA „natürlichen“ Verknüpfung. Ohne die Zugabe des Templats fand keine Produktbildung statt. Bei einer Fehlpaarung an einem Ende des Templats konnte noch eine Ligation detektiert werden.

Zum Vergleich wurde dieses Experiment auch an RNA der gleichen Sequenz und zwei Tetramer-2',3'-Cyclophosphaten durchgeführt. Die Reaktion verlief hier ineffizienter als bei der p-RNA. Außerdem bildete sich ausschließlich die ungewollte 2',5'-Verknüpfung aus<sup>4</sup> [28].

<sup>2</sup> RNA besteht aus Ribose in der Furanose-Form

<sup>3</sup> Experimentelle Bedingungen: 1.5 M LiCl, pH 8.5, Raumtemperatur, 0.45 mM Cyclophosphat, 0.15 mM Templat, 60% Ausbeute nach einer Woche

<sup>4</sup> Zur Bildung einer 3',5'-Verknüpfung durch templatkontrollierte chemische Ligation siehe [29],[30].

Es wurde auch nachgewiesen, wie sich p-RNA-Tetramer-Cyclophosphate zu längeren Einheiten verbinden können, wenn sie teilweise aus komplementären Strukturen bestehen. Aus dem Tetramer pr(4'ATCG)-2',3'-Cyclophosphat bildeten sich nach acht Wochen die Produkte, (als Produkt wird alles bezeichnet, was länger als die Tetramere war) mit einem Anteil von über 70% (Bild 7) [31].

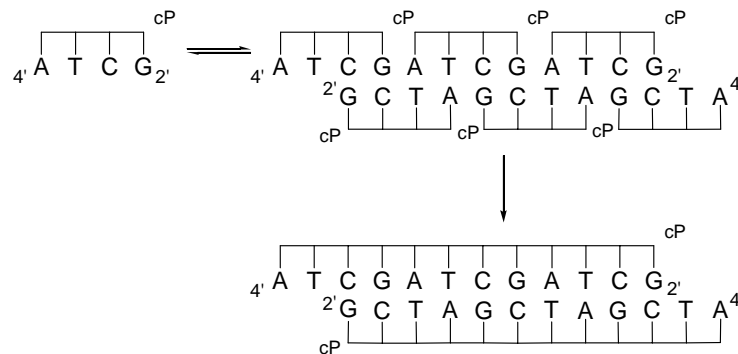


Bild 7: Bildung längerer Oligomere aus Tetrameren

Eine sehr interessante neuartige Nucleinsäure stellt das Threofuranosyl-Oligonucleotid TNA dar. TNA ist eine aus Tetrose aufgebaute Nucleinsäure mit 3',2'-Phosphodiester-Brücken (Bild 8). Sie ist somit die strukturell einfachste aller bisher untersuchten künstlichen Nucleinsäuren. TNA ist in der Lage, sowohl mit DNA als auch mit RNA über Watson/Crick-Paarungen Duplexe zu bilden [32]. Durch Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, warum TNA stabile Duplexe bildet [33]. Im Vergleich zu RNA ist eine präbiotische Synthese von TNA wahrscheinlicher [34].

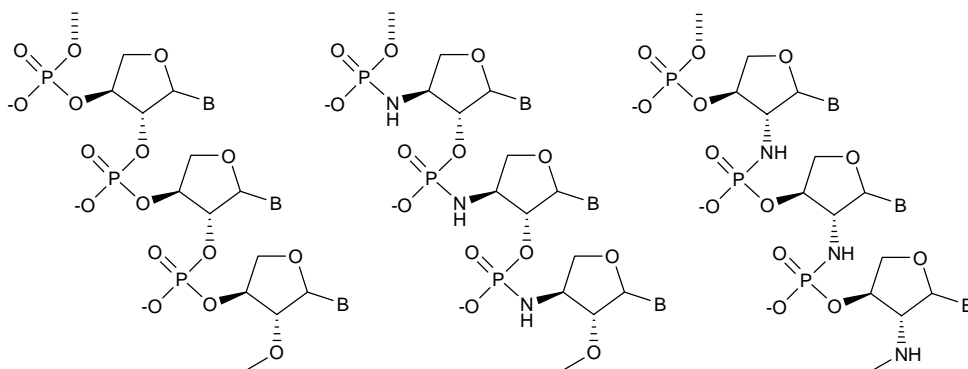


Bild 8: TNA (links) und TNA mit Phosphoramidat-Brücke

Experimente und einem Duplex aus A/T-Basenpaaren mit einem Duplex aus D/T-Basenpaaren zeigten, dass durch D eine deutliche Erhöhung der

Duplexstabilität erreicht wurde [35]. Befand sich bei Ligationsexperimenten an der Ligationsstelle ein D anstelle eines A, wurde die Reaktion erheblich beschleunigt [36].

In neuesten Veröffentlichungen wurde von einer TNA berichtet, die anstelle aus Phosphodiestern eine Phosphoramidat-Bindung enthielt [37], und von einer TNA, die als Templat für eine enzymatische DNA-Synthese diente [38]. Auch die Synthese einer TNA gelang auf enzymatischem Weg [39].

Nachdem man sich in intensiven Untersuchungen mit dem Ursprung der Nucleinsäuren beschäftigt hat, und eine präbiotische Synthese wahrscheinlich erscheint, gilt es die nächste offene Frage zu klären. Wie haben sich aus den Mononucleotiden unterschiedlich lange Oligomere mit verschiedensten Sequenzen bilden können und wie konnten sie ihre Information weitergeben?

Am erfolgreichsten verliefen hierzu Arbeiten von J. P. Ferris. Er katalysierte durch die Verwendung von Tonmineralien (Na<sup>+</sup>-Montmorillonite) die Polymerisation von Nucleosid-5'-O-Phosphorimidazoliden (Bild 9) und erhielt dabei ein Verhältnis der 3',5'-Verknüpfung zur 2',5'-Verknüpfung von 2:1 [40],[41]. Diese Oligomere konnten aus bis zu 55 Nucleotiden bestehen [42] und als Templat in einer anschließenden nichtenzymatischen Oligomerisierung dienen [43],[44].

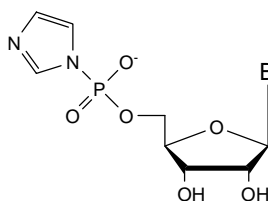


Bild 9: Nucleosid-5'-phosphorimidazolid

Spätere Arbeiten von Ferris beschäftigten sich mit der Sequenz- und Regioselektivität der von Montmorillonite katalysierten Reaktionen [45].

Wie eine Nucleinsäure in einer präbiotischen Welt vervielfältigt werden konnte, versuchte L. E. Orgel mit dem Schwerpunkt der nichtenzymatischen Oligomerisierung von Nucleinsäuren seit mehreren Jahren zu beantworten. In seinem Modell kondensierten aktivierte Monomere an einem Templat zu einem Oligonucleotid, dessen Sequenz komplementär zu der des Templats ist. Eine

ausführliche Beschreibung dieses Themas ist in Kapitel 2.2 wiedergegeben [46],[47].

G. v. Kiedrowski gelang 1986 Selbstreplikation einer Nucleinsäure am Beispiel eines DNA Hexanucleotids. Mit Hilfe der templatgesteuerten Ligation verknüpfte er an dem Templat 5'CCGCGG3' die zwei Trimere 3'GGC5' und 3'GCC5' mit einem Carbodiimid zu dem Hexamer 3'GGCGCC5'. Dieses neu gebildete Hexamer war eine exakte Kopie des Templats und konnte die Ligation zwei neuer Trimere katalysieren (Bild 10) [48].

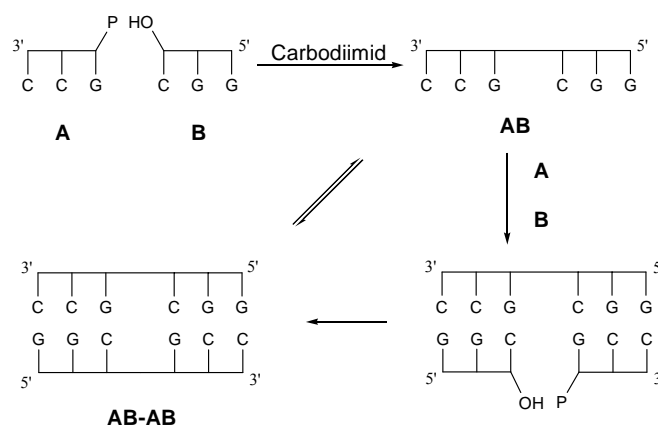


Bild 10: Selbstreplizierendes Hexanucleotid

Anders als man für eine solche Autokatalyse vielleicht erwarten könnte, verlief die Zunahme der Templatkonzentration nicht exponentiell, sondern parabolisch. Dieses Ergebnis hat unter dem Begriff „Quadratwurzelgesetz der Autokatalyse“ Eingang in die Literatur gefunden [49],[50],[51].

Später gelang von Kiedrowski nach dem gleichen Prinzip die Verknüpfung zweier Trimere zu einem Hexamer mit einer zentralen Phosphoramidatbindung [52]. Dieses Experiment beruhte auf einem Konzept von Orgel [53].

In diesem Zusammenhang berichtete Kanavarioti kürzlich über die Polymerisation in der eutektischen Phase einer Eis-Matrix. Der Einbau von Purinen und Pyrimidinen verlief gleich schnell [54].

Einen anderen Ansatz zur Selbstreplikation verfolgte K. C. Nicolaou 1994. An einen DNA-Duplex aus einem Homopurin-Strang mit einem Homopyrimidin-Strang lagerten sich über Hoogsteen-Basenpaarung zwei kürzere Homopyrimidin-Oligomere an und bildeten eine Tripelhelix. Sie wurden mit

Cyanimidazol ligiert und dienten nach der Ablösung vom ursprünglichen Doppelstrang als Templat für die Ligation von zwei kurzen Homopurin-Oligomeren. Der so erhaltene DNA-Duplex war aufgrund der gewählten Sequenz identisch mit dem Ausgangs-Duplex [55].

Es gibt also Indizien, wie das Leben auf der Erde nach der Hypothese der RNA-Welt entstanden sein könnte. Noch offen ist die Frage, ob die beschriebenen Reaktionen in flüssiger Phase, der sog. Ursuppe oder an fester Phase abliefen [56]. Es ist auch denkbar, dass sog Vesikel als Protozellen eine wichtige Rolle in der Kompartimentierung der Reaktionsorte gespielt haben könnten [57].



## 2.2 Nichtenzymatische Oligomerisierung

Die enzymfreie Replikation der genetischen Information spielt gerade im Hinblick auf die Entstehung und Entwicklung der präbiotischen RNA-Welt eine wesentliche Rolle.

Ein Vorreiter auf diesem Gebiet ist L. E. Orgel, der sich seit den 60er Jahren mit der nichtenzymatischen Selbstreplikation der Nucleinsäuren DNA und RNA beschäftigt [58]. Zu Beginn seiner Studien untersuchte er hierbei die Oligomerisierung von Adenosin-5'-Monophosphat an einem PolyU Templat. Nach Aktivierung der 3'-OH-Gruppen mit dem Carbodiimid CDI zeigte sich, dass nur das zu PolyU komplementäre A zu Oligomeren kondensierte. Das festigte die Idee der Selektivität der Watson/Crick-Paarung, die für eine Übertragung von Information, d.h. das fehlerfreie Kopieren von mehr als einer Base, wichtig ist [59].

Später setzte Orgel neuartige aktivierte Monomere, nämlich Derivate der Nucleotid-5'-Monophosphate ein, die sog. Nucleotid-5'-O-Phosphorimidazolide ImpN. Es zeigte sich aber, dass bei der Reaktion von Adenosin-5'-O-Phosphorimidazolid ImpA mit PolyU als Templat überwiegend eine 2',5'-Verknüpfung entsteht<sup>5</sup>. Das wurde auf die sechs Mal höhere Nucleophilie der 2'-OH-Gruppe im Vergleich zur 3'-OH zurückgeführt. Eine helicale Anordnung der Monomere erhöhte die Reaktivität noch einmal um den Faktor 3 [60].

Gab man zu diesem System aus A und PolyU  $Pb^{2+}$ -Ionen, oder ließ man Guanosin-5'-O-Phosphorimidazolid ImpG an einem PolyC Templat in Anwesenheit von  $Zn^{2+}$ -Ionen reagieren, bildeten sich die natürliche 3',5'-Verknüpfungen aus. Als Grund gab Orgel eine Änderung der Geometrie der Helices durch den Einfluss der Kationen an [61].

---

<sup>5</sup> Den Nachweis, ob der Einbau mit 2',5' oder mit 3',5'-Verknüpfung ablief, lieferte der enzymatische Abbau mit Ribonuclease T1, die spezifisch 3',5'-Verknüpfungen spaltet.

1981 führte das Laboratorium um Orgel Untersuchungen zu unterschiedlich substituierten Phosphorimidazoliden durch. Dabei stellte sich heraus, dass die Reaktionen mit Guanosin-2-Methyl-Phosphorimidazolid 2-MeImpG **3** (Bild 11) als Substrat am erfolgreichsten verliefen. An einem PolyC Templat bildeten sich Oligomere mit bis zu 20 Guanosen (Bild 12). Die Verknüpfung dieser G<sub>20</sub> bestand bevorzugt aus 3',5'-Bindungen. Auf die Zugabe der Ionen Zn<sup>2+</sup> und Pb<sup>2+</sup> konnte verzichtet werden.

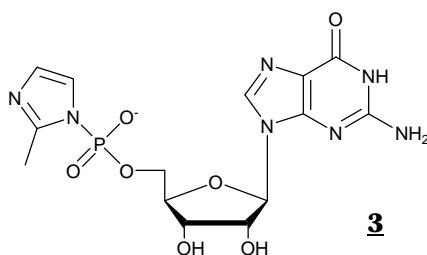


Bild 11: Guanosin-2-Methyl-Phosphorimidazolid 2-MeImpG **3**

Orgel begründete die Bevorzugung der 3',5'-Verknüpfung mit einer durch die 2-Methyl-Gruppe induzierten Änderung der Sekundärstruktur. Das hat zur Folge, dass sich die 3'-OH-Gruppe zur P-N-Bindung in einem Winkel von 180° anordnet [62].

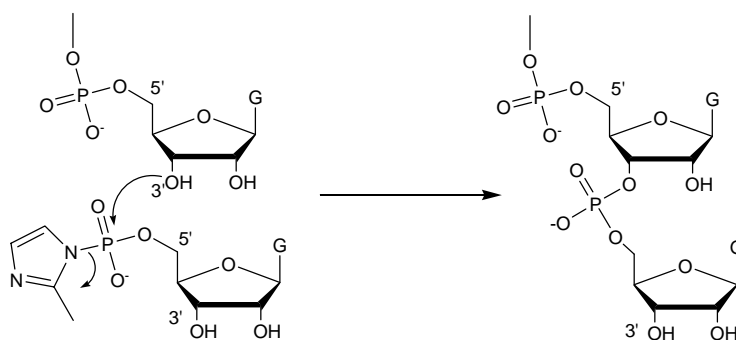


Bild 12: Die Kettenverlängerung mit 2-MeImpG verläuft von 5' in 3'-Richtung

Später gelang mit diesem neuen Substrat die Übertragung von Information von Templaten, die aus C und G aufgebaut sind, auf einen neu gebildeten Strang. So bildete sich aus dem DNA-Templat „d(CCGCC)“ das komplementäre „GGCGG“ zu 17% [63], und auch das 14mer Templat „d(C<sub>3</sub>GC<sub>3</sub>GC<sub>3</sub>GC<sub>2</sub>)“ ließ sich erfolgreich in sein komplementäres Oligonucleotid umschreiben [64]<sup>6</sup>.

<sup>6</sup> siehe auch [65],[66]

1991 stellte Orgel ein verbessertes Testsystem zur Untersuchung der nichtenzymatischen Oligomerisierung vor [67]. Er konstruierte einen DNA-Hairpin mit einem terminalen Ribo-Baustein. An dem 3'-Ende, das als Primer diente, fand die Kettenverlängerung statt. Am überstehenden 5'-Ende, welches gleichzeitig das Templat war, trug der Hairpin zur besseren Detektion eine  $^{32}\text{P}$ -Markierung (Bild 13). Die Analytik erfolgte mittels denaturierender Gelelektrophorese gefolgt von einer Quantifizierung der gebildeten Produkte mit Hilfe des radioaktiven Labels.

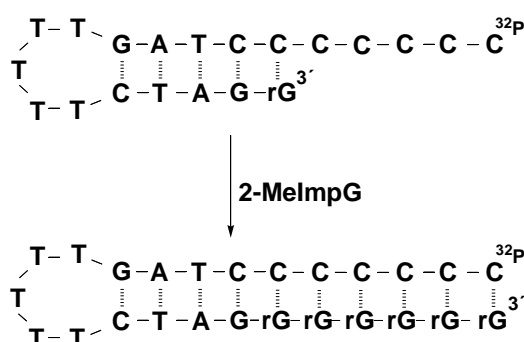


Bild 13: Hairpin-System nach Orgel

Als allgemeine Tendenz ließ sich ableiten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in einem Temperaturbereich von 0-37°C anstieg, bei 50°C war keine Verlängerung mehr festzustellen. Messungen zur Konzentrationsabhängigkeit führten zum Ergebnis, dass bis zu 0.05 M Imidazolid-Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit anstieg. Bei noch größeren Werten blieb sie dann nahezu konstant. Durch einen großen Überschuss der Imidazolide gegenüber dem Hairpin konnte eine Reaktion Pseudo-Erster-Ordnung angenommen werden. Die Kondensation war unabhängig vom pH-Wert in einem Bereich von 6.5-8.

Für die Reaktion, die in Bild 13 dargestellt ist, wurde eine Halbwertszeit von 3 h ermittelt ( $T = 0^\circ\text{C}$ ). Bei Austausch des terminalen rG durch ein dG, verzehnfachte sich die Halbwertszeit auf 30 h. Die Begründung hierfür liegt in dem niedrigeren  $\text{pK}_a$ -Wert eines Ribonucleotids von 12.5 gegenüber einem Wert von 14 bei einem Desoxyribonucleotid. Der Einbau des letzten Nucleotids verlief stets stark verlangsamt, da sich hier die fehlende Stapelwechselwirkung eines benachbarten G's auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirkte. Der Einbau der Monomere vollzog sich ausschließlich mit 3',5'-Verknüpfung.

Bei einer hohen Konzentration von  $\text{Na}^+$ -Ionen neigt G zur Bildung einer stabilen Sekundärstruktur, den G-Tetraden (Bild 14). Da eine effiziente Oligomerisierung aber einzelsträngige Template benötigt, wird eine Reaktion dadurch erschwert.

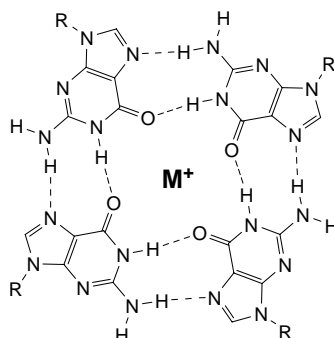


Bild 14: G-Tetraden mit einem Alkali-Kation als Zentralion

Die hohe Nachweisempfindlichkeit des Labels erlaubte es, die G-Tetradenbildung durch die Absenkung der Konzentration des Hairpins in den nanomolaren Bereich zu unterdrücken. Dadurch war es möglich, auch die Oligomerisierung von C an einem „homo(dG)“ Templat zu beobachten.

Allerdings war hier der Einbau des letzten C so stark verlangsamt, dass er nahezu ausblieb. Auch hier ist die Ursache in der fehlenden Stapelwechselwirkung des benachbarten Nucleotids zu sehen.

Eine schnelle und effiziente Kettenverlängerung an einem Templat, das sowohl aus G als auch aus C besteht, konnte mit der Zugabe von 2-MeImpG und 2-MeImpC erzielt werden [68].

Die Erweiterung der Untersuchung auf das A/T-Basenpaar führte zu neuen Hindernissen. Während zwar ein einzelnes A oder T in einem „homo(dC)“ Templat leicht kopiert werden konnte, führten jedoch schon einzelne A und T in einem „homo(dG)“ Templat zu sehr ineffizienten Reaktionen. Dieses Resultat lässt sich leicht durch die schwächere Bindung des A/T-Basenpaars aufgrund von nur zwei Wasserstoffbrücken zurückführen (das G/C-Basenpaar besteht aus drei Wasserstoffbrücken) (Bild 18).

Ein weiterer Nachteil von T bestand darin, dass die Wobble-Paarung zwischen T und G den Fehleinbau von G gegenüber von T ermöglichte. Das passierte vor allem dann, wenn bei einem Templat, das aus einem isolierten T in einer „homo(dC)“ Sequenz bestand, nur mit 2-MeImpG inkubiert wurde. Durch die Wobble-Paarung bildete sich zu 25% die unnatürliche 2',5'-Bindung aus (Bild 15). Waren der Reaktion aber sowohl 2-MeimpG und 2-MeImpA zugefügt worden, wurde gegenüber T nur das komplementäre A eingebaut [69].

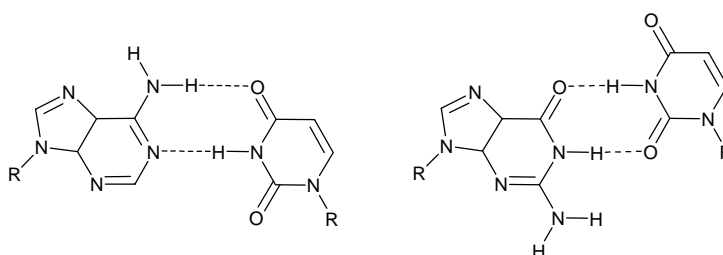


Bild 15: A/U- (links) und G/U-Wobble-Paar (rechts)

Aus Orgels Studien ging hervor, dass TT, GT und TG in einem „homoC“ Templat als partielle Barrieren und AT, TA, AA, GA und AC als absolute Barrieren wirkten. Für eine nichtenzymatische Replikation mit Monomeren als Substrat benötigte man seiner Ansicht nach einen wirkungsvollen Katalysator [70].

Theoretische Arbeiten von Kanavarioti zu templatgesteuerten Oligomerisierungen bestätigten die von Orgel veröffentlichten Ergebnisse [71],[72].

Auf der Grundlage des Haipin-Systems erfolgte in der Arbeitsgruppe von M. W. Göbel eine Weiterentwicklung mit einem anderen Detektionsverfahren [73]. Ein kurzes Oligonucleotid markierte man mit einem intercalierenden Fluoreszenzfarbstoff (Bild 16). Dieses Konstrukt diente in den Experimenten als Primer. Der Farbstoff - ein Acridinderivat – (Bild 17) ermöglichte den Verzicht auf das radioaktive  $^{32}\text{P}$  und stabilisierte durch Intercalation die Bindung zwischen Templat und Primer. Die Analytik wurde an einem RP-HPLC-System mit einem UV- und einem Fluoreszenz-Detektor durchgeführt. Auch hier zeigten sich zwei Vorteile des Labels. Zum einen veränderte die Lipophilie des Acridins die Laufeigenschaften des Primers und seiner Verlängerungsprodukte und erleichterte so die eindeutige Zuordnung. Zum anderen konnte man bei der Verwendung eines Fluoreszenz-Detektors alle Nebenprodukte und

Reaktionspartner ausblenden. Weitere Vorteile waren die größere Variabilität durch die Trennung von Primer und Templat und die Schützung des 5'-Endes durch den Farbstoff gegen Pyrophosphatbildung [74].

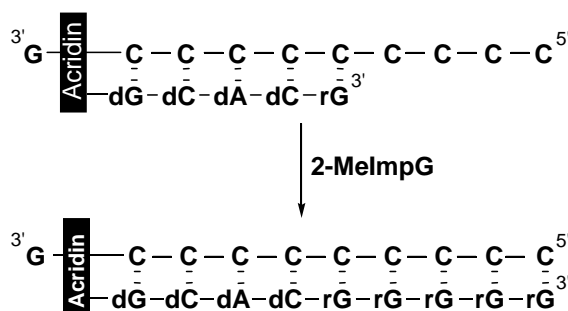


Bild 16: Testsystem nach Göbel [75]

Mit diesem neuen Testsystem konnten die Ergebnisse der Oligomerisierung von G an einem „homo(dC)“ Templat von Orgel reproduziert werden. Außerdem war es durch die Absenkung der  $\text{Na}^+$ -Ionen Konzentration möglich, die Selbstaggregation G-reicher Template zu unterdrücken und somit eine effiziente Verlängerung des Primers durch Inkubation mit 2-MeImpC zu detektieren.

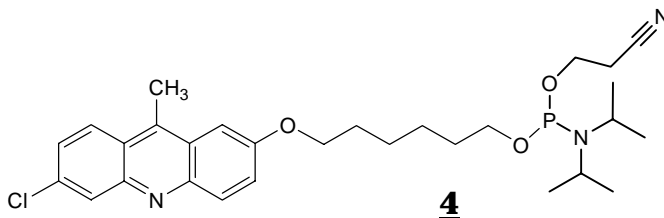


Bild 17: Struktur des verwendeten Acridin-Phosphoramidits **4**

Es zeigten sich Unterschiede in Reaktionsgeschwindigkeit und Effizienz, wenn man den Primer entweder ganz aus RNA oder aber aus DNA mit einem terminalen Ribonucleotid aufbaute. Das Templat bestand dabei immer aus DNA. Reaktionen an nur aus RNA bestehenden Primern verliefen schneller, da für eine reibungslose Oligomerisierung eine Doppelhelix in der A-Form nötig ist. DNA/RNA-Hybride liegen in dieser A-Form vor. Bei einem Primer aus DNA mit einem terminalen Ribonucleotid bildete sich die A-Form erst nach der

Kondensation des ersten Phosphorimidazolids aus, wodurch dieser erste Schritt stark verlangsamt verlief [75],[76],[77]<sup>7</sup>.

C. Switzer nutzte das Orgel'sche Testsystem zur Untersuchung weiterer Fragestellungen. Bei dem Vergleich eines Templats aus 3',5'-Verknüpfung mit einem Templat aus 2',5'-Verknüpfung, stellte sich heraus, dass das 3',5'-verknüpfte Templat 17 mal besser die Verlängerung des Primers unterstützte. Noch größer war der Unterschied, wenn man als Vergleich ein Templat aus alternierenden 2',5'- und 3',5'-Bindungen heranzog. Hier verlief die Reaktion mit dem 3',5'-verknüpften Templat sogar bis zu 28 mal effizienter. Ein weiterer Nachteil einer 2',5'-Bindung ist ihre höhere Hydrolyseempfindlichkeit gegenüber einer 3',5'-Bindung [79].

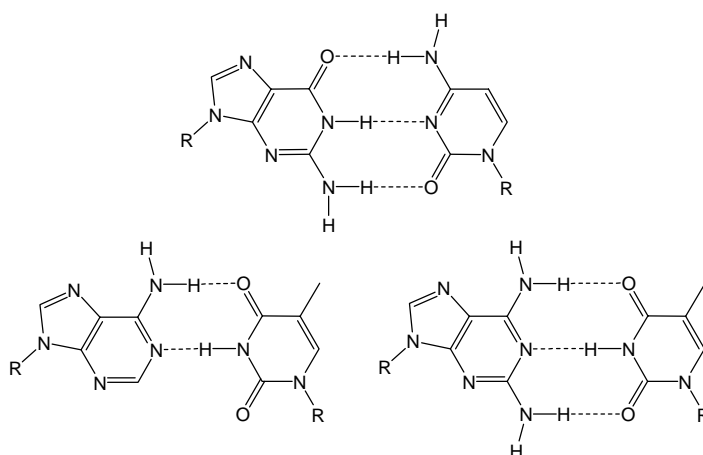


Bild 18: G/C- (oben) A/T- (unten links) und D/T-Basenpaar (unten rechts)

In einer späteren Arbeit untersuchte Switzer das isoG/isoC-Basenpaar in seinen Eigenschaften in der nichtenzymatischen Oligomerisierung (Bild 19). Ein Templat, das ein isoliertes d(isoG) in einer „homo-dC“ Sequenz enthielt, führte bei Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImp(isoC) zum vollverlängerte Produkt. Dabei war kein Fehleinbau von isoC gegenüber G oder von G gegenüber isoG zu beobachten. Ersetzte man im Templat das d(isoG) durch ein dG und inkubierte mit 2-MeImpG und 2-MeImp(isoC), bildete sich in Spuren das vollverlängerte Produkt, was aber auf einen Fehleinbau von G zurückgeführt werden konnte [80].

<sup>7</sup> Zum Vergleich von DNA und RNA-Templaten siehe [47].

Ein weiteres Basenpaar, mit dem sich Switzer befasste, war das Up (5-Propynyluracil)/D Basenpaar (Bild 19). Switzer konstruierte einen Hairpin mit einem Templat bestehend aus entweder sieben T oder sieben Up-Nucleotiden. Er inkubierte mit 2-MeImpA und 2-MeImpD. Es stellte sich heraus, dass nur in der Kombination Up/D eine effiziente Kettenverlängerung stattfand. Hier bildete sich nach 10 d das um sechs Einheiten verlängerte Produkt mit 3',5'-Verknüpfung in guten Ausbeuten [81]. Der Grund war, dass in diesen Untersuchungen das Up/D Basenpaar das einzige war, das drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden konnte.

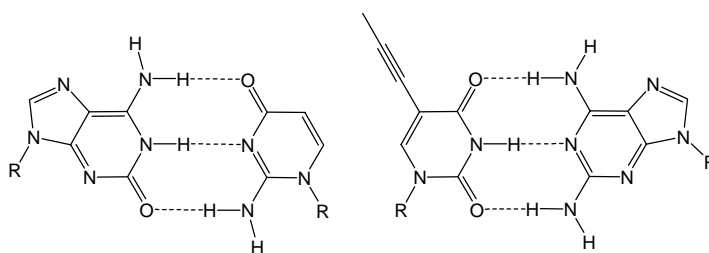


Bild 19: isoG/isoC- (links) und Up/D Basenpaar (rechts)

Schon vorher beschäftigten sich auch die Gruppen von Göbel und Orgel mit den Eigenschaften von D in der nichtenzymatischen Oligomerisierung. Beide wiesen auf die verbesserten Möglichkeiten durch Diaminopurin hin.

Bei Göbel bestand das Templat u.a. aus bis zu drei aufeinander folgenden T in einem „homo(dC)“ Templat. Inkubiert wurde entweder mit einer Mischung aus 2-MeImpG und 2-MeImpA oder aber aus 2-MeImpG und 2-MeImpD. Es bildeten sich nur Produkte in nennenswerten Ausbeuten, wenn 2-MeImpD als Substrat der Reaktion zugesetzt wurde. Drei aufeinander folgende T im Templat wirkten bei der Inkubation mit 2-MeImpA als absolute Barriere, mit 2-MeImpD war jedoch eine Produktbildung zu detektieren.

Der Grund für die deutlich verbesserte Oligomerisierung mit D anstelle von A wurde in der Erhöhung der Anzahl der Wasserstoffbrücken von zwei auf drei gesehen. D bildet mit T oder U drei Bindungen, wogegen A mit T oder U nur zwei bildet (Bild 18).

Beim Vergleich der beiden jeweils aus drei Wasserstoffbrückenbindungen bestehenden D/T- und G/C-Basenpaare zeigte sich, dass beim G/C-Basenpaar



die Reaktionen schneller und effizienter verliefen. Diese Beobachtung liegt in den sekundären elektrostatischen Wechselwirkungen begründet [82],[83].

Bereits 1982 publizierte Orgel Ergebnisse, in denen die Substitution aktivierter A- durch D-Monomere bei der Polymerisation an PolyU zu verbesserten Ausbeuten führte [84].

Ergänzend untersuchte Orgel den Einbau von U gegenüber einem Templat, das mindestens an einer Stelle aus D oder A bestand. Enthielt das Templat nur ein D oder A, zeigte sich bei der Inkubation mit oder ohne Primer erneut der große Vorteil von D in Polymerisationsreaktionen. Bestand das Templat aber aus mehreren aufeinander folgenden A oder D, konnten nach der Zugabe von 2-MeImpU keine Verlängerungsprodukte detektiert werden [85]. Das liegt an der geringen Neigung von T und U, eine Stapelwechselwirkung untereinander einzugehen. Dadurch geht ein wichtiger Beitrag zur Selbstorganisation der Monomere verloren.

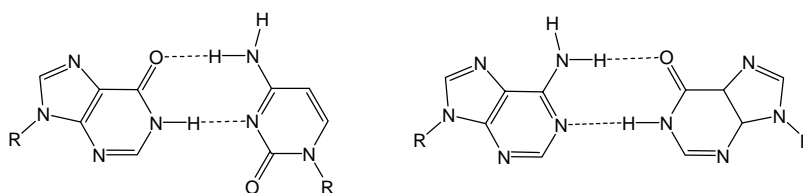


Bild 20: I/C Basenpaar (links) und mögliches A/I-Basenpaar (rechts)

In der selben Arbeit stellte Orgel dem G/C-Basenpaar das I (Inosin)/C-Basenpaar gegenüber, das aus nur zwei Wasserstoffbrücken besteht (Bild 20). Wie zu erwarten war, verschlechterten sich die Ausbeuten bei der Inkubation mit 2-MeImpC beim Übergang von einem „homo(dG)“ Templat zu einem Templat, das zusätzlich I enthielt, dramatisch. Überraschend war jedoch, dass das I/C-Basenpaar sogar schlechter war als das A/U-Basenpaar, obwohl beide über die gleiche Anzahl an H-Brücken verfügten. Eine Begründung dafür konnte bisher nicht angegeben werden [85]. Eine postulierte Oligomerisierung durch ein mögliches A/I-Basenpaar konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich zur Erweiterung der Untersuchungen auf die nichtnatürliche Basen D und I wurden in den letzten Jahren Experimente zu Nucleinsäuren mit modifiziertem Rückgrat und Nucleinsäuren-Analoga durchgeführt. P. E. Nielsen

und Orgel führten die PNA (*Peptide Nucleic Acid*) in Untersuchungen zur templatgesteuerten Oligomerisierung ein. PNA ist ein zu Oligonucleotiden analoges achirales Polyamid, das mit RNA und DNA Doppelhelices mit Watson/Crick-Basenpaaren bildet (Bild 21).

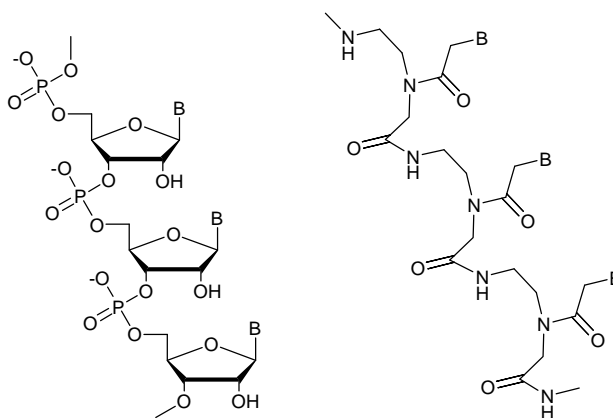


Bild 21: Strukturen von RNA (links) und PNA (rechts) im Vergleich

Ein PNA- $C_{10}$  Oligomer eignete sich z.B. als Templat bei der Inkubation mit 2-MeImpG. Es bildete sich dabei ein RNA- $G_{10}$ -Oligomer mit einer 3',5'-Verknüpfung. Allerdings ist diese Reaktion weniger effizient als bei der Verwendung von Templaten bestehend aus DNA oder RNA. Auch der umgekehrte Fall, der Aufbau eines PNA-Oligomers an einem DNA-Templat, verlief erfolgreich. An ein DNA- $C_{10}$ -Oligomer wurden PNA- $G_2$ -Dimere ankondensiert und mit EDC zu einem PNA- $G_{10}$ -Oligomer verknüpft [86].

Weiterhin gelang es erfolgreich, einen Informationstransfer sowohl von DNA zu PNA, als auch von PNA zu RNA nachzuweisen. So wurde u.a. das DNA-Templat „ $C_4T_2C_4$ “ in „PNA- $G_4A_2G_4$ “ kopiert, wenn PNA- $G_2$ - und PNA- $A_2$ -Dimere als Substrate verwendet wurden, die mit EDC aktiviert wurden. Die Wobble-Paarung war auch hier der Grund, dass ein Fehleinbau von G beobachtet wurde, wenn man ausschließlich mit G inkubierte [87].

Ein PNA-Templat mit der Sequenz „ $C_5XC_4$ “ mit  $X = A, G$  oder  $T$  lieferte bei der Inkubation mit den entsprechenden 2-Methyl-Phosphorimidazoliden in guten Ausbeuten das komplementäre RNA-Oligomer. War aber auch hier als einziges Substrat 2-MeImpG zugefügt worden, erfolgte ein Fehleinbau von G gegenüber A, T und G (Bild 15). Der verlangsamte Einbau des letzten Nucleotids bei PNA-Templaten war hier noch ausgeprägter als bei DNA- oder RNA-Templaten [88].

Anhand der PNA wurde auch das Phänomen der chiralen Kreuzinhibierung näher beschrieben. Als nicht chirales Templat kann PNA nicht zwischen Nucleotiden unterschiedlicher Chiralität unterscheiden. Deshalb führte die Oligomerisierung PNA-C<sub>10</sub> entweder mit 2-MeImpG<sub>L</sub> **ent-3** oder 2-MeImpG<sub>D</sub> **3** allein zu ähnlichen Verlängerungsprodukten bis zu einer Länge von G<sub>10</sub>. Setzte man aber eine racemische Mischung beider Phosphorimidazole ein, bildeten sich höchstens Tetramere (Bild 22). Der Grund waren die entgegen gesetzten Händigkeiten der Helices, die sich mit D- oder L- Monomere ausbildeten [89].

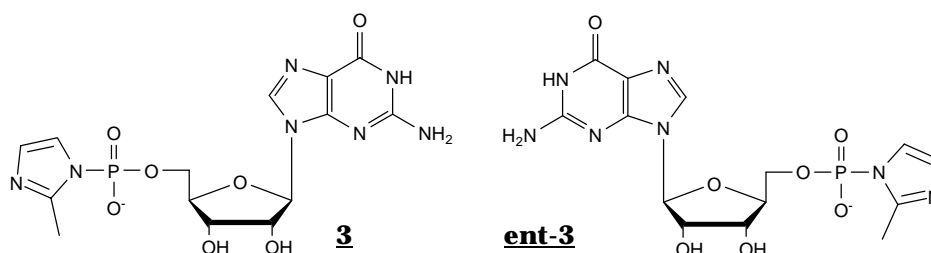


Bild 22: Strukturen von 2-MeImpG<sub>D</sub> **3** und 2-MeImpG<sub>L</sub> **ent-3**

Diese Beobachtungen entsprachen denjenigen, die Orgel schon 1984 gemacht hatte. Er zeigte, dass sich für die Oligomerisierung an einem PolyC<sub>D</sub> auch nur Phosphorimidazole der gleichen Chiralität eigneten.

Ohne Zugabe eines Templats reagierten 2-MeImpG<sub>D</sub> und 2-MeImpG<sub>L</sub> gleich, sie bildeten ähnlich lange Oligomere. Inkubierte man aber an einem PolyC<sub>D</sub> Templat mit einer racemischen Mischung von 2-MeImpG<sub>D</sub> und 2-MeImpG<sub>L</sub>, führte der Einbau von G<sub>L</sub>, der sowohl mit 2',5'- als auch mit 3',5'-Verknüpfung ablief, zu einem sofortigen Kettenabbruch [90].

Ähnliche Resultate lieferten Experimente mit Templaten gemischter Chiralität. Befand sich in einem „homo(dC<sub>D</sub>)“ Templat ein oder zwei dC<sub>L</sub>-Nucleotide, wurde die Reaktion zwar stark verlangsamt, aber nicht völlig unterbunden. Erst drei aufeinander folgende dC<sub>L</sub>-Nucleotide führten zum Kettenabbruch. An einem Templat bestehend aus alternierenden dC<sub>D</sub>- und dC<sub>L</sub>-Nucleotiden führte weder die Inkubation mit 2-MeImpG<sub>D</sub>, noch mit 2-MeImpG<sub>L</sub> oder mit einer racemischen Mischung zu einer nennenswerten Produktbildung [91].

Um das Problem der Kreuzinhibierung zu umgehen, wurden einfachere Strukturen vorgeschlagen, die den Nucleinsäuren analog aufgebaut sind. Diese Analoga sind acyclisch, flexibel und prochiral[92]<sup>8</sup>.

Switzer griff die Idee auf und untersuchte eine der vorgeschlagenen Strukturen im Hinblick auf die nichtenzymatische Oligomerisierung. Er inkorporierte in einen Hairpin an einer oder an mehreren Stellen sog. Glyceryl-Cytidine glyC in eine „homo(dC)“ Sequenz und inkubierte mit 2-MeImpG (Bild 23). Dabei fand er heraus, dass glyC die Oligomerisierung zwar behinderte, aber nicht völlig blockierte. Bei den Templaten (glyC)d(CCCCC) und (glyC)<sub>2</sub>d(CCCCC) bildete sich das vollverlängerte Produkt in guten Ausbeuten. Die Enantiomere glyC<sub>D</sub> und glyC<sub>L</sub> führten beide zu einer Produktbildung. Die Stärke des glyC/G-Basenpaars stellte sich als schwächer als das C/G-Basenpaar, aber stärker als das T/G-Basenpaar heraus [93].

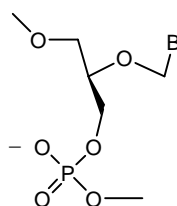


Bild 23: Acyclische Glycerol Nucleinsäure nach Switzer [93]

Weitere Nucleinsäuren, die mit RNA und DNA verwandt sind, stellen die *Hexitol Nucleic Acids* HNA und *Altritol Nucleic Acids* ANA dar, die vor wenigen Jahren von P. Herdewijn vorgestellt wurden (Bild 24) [94]. HNA ist aus einem 1,5-Anhydrohexitol-Rückgrat und den entsprechenden Nucleobasen aufgebaut. Sie bildet mit komplementären RNA oder DNA Duplexe der A-Form, deren Stabilität höher ist als die entsprechenden DNA und RNA-Duplexe [94],[95],[96]. Kürzlich wurde die Kristallstruktur eines HNA-Duplexes aufgeklärt [97].

---

<sup>8</sup> Diese auch als prä-RNA bezeichneten Nucleinsäure Analoga spielen auch im Hinblick auf ihre präbiotische Synthese eine große Rolle [92].

ANA ist durch eine zusätzliche OH-Gruppe am Zucker die Hydroxy-Form der HNA. Auch sie bildet mit DNA und RNA Duplexe der A-Form, die im Vergleich zu HNA sogar noch etwas stabiler sind [98] (Bild 24).

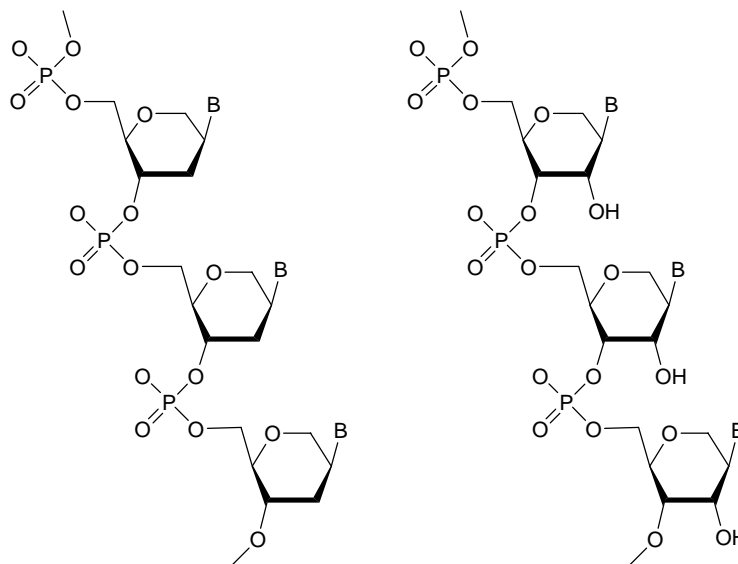


Bild 24: Strukturen von HNA (links) und ANA (rechts)

Herdewijn und Orgel konnten in Oligomerisierungsexperimenten mit 2-MeImpG zeigen, dass ein „HNA-C<sub>10</sub>“ Templat effizienter die Reaktion steuerte als die entsprechenden DNA und RNA Template. Sie begründeten ihre Ergebnisse damit, dass HNA/RNA-Duplexe stärker in der A-Form präorganisiert sind als DNA/RNA-Duplexe, was ja für eine effiziente Oligomerisierung als Voraussetzung gilt [99]

Untersuchungen, ob sich HNA auch zur Übertragung von Information eignet, zeigten, dass sich an dem Templat „HNA-C<sub>4</sub>XC<sub>4</sub>“ (X = G, T, A) der Primer „<sup>32</sup>P-(dG<sub>3</sub>)-rG“ sehr effizient verlängern ließ. Als Substrate dienten die jeweiligen komplementären 2-Methyl-Phosphorimidazole. Auch hier stellte sich HNA als besseres Templat als RNA heraus. Der Fehleinbau von G an T durch Wobble-Paarung war im Vergleich zu RNA weniger stark ausgeprägt<sup>9</sup>. Sogar die Sequenz „C<sub>4</sub>UC<sub>4</sub>“ ließ sich bei Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpA zu 95% in das entsprechende 8mer kopieren [99]. Ein weiterer Vorteil

<sup>9</sup> Das G/U-Basenpaar bei RNA neigt stärker zu Wobble-Paarung als das G/T-Basenpaar bei DNA [47].

der HNA war, dass auch mit 2-MeImp(dG) als Substrat die Bildung von Oligomeren an „HNA-C<sub>10</sub>“ Templaten im Gegensatz zur Reaktion an dC<sub>10</sub> Templaten beobachtet werden konnte<sup>10</sup>. Aktivierte HNA-Monomere oligomerisierten allerdings kaum an Templaten aus HNA, DNA und RNA, es kam in allen Fällen nur zur Bildung von höchstens Tetrameren.

Der Nachweis einer enantiomeren Kreuzinhibierung führte zu den schon bekannten Ergebnissen. „HNA<sub>D</sub>-C<sub>10</sub>“ ergab mit L-Monomeren keine verlängerten Produkte, HNA war im Vergleich sogar noch enantioselektiver als RNA und DNA [101].

ANA ist noch effektiver in der nichtenzymatischen Oligomerisierung als HNA. In allen Punkten entsprechen die Resultate, die sich aus Experimenten mit ANA ergaben, den gezeigten Daten zur HNA. Der Informationstransfer verlief ähnlich erfolgreich. Besonders erwähnenswert ist, dass eine Inkubation von 2-MeImpG und 2-MeImpU an einem „ANA-C<sub>4</sub>AC<sub>4</sub>“ Templat zweimal effizienter verlief als an „HNA-C<sub>4</sub>AC<sub>4</sub>“.

„ANA<sub>D</sub>-C<sub>10</sub>“ ergab mit L-Monomeren keine Produkte, wie HNA war auch ANA enantioselektiver als RNA und DNA. Auch aktivierte ANA-Monomere oligomerisierten nicht an Templaten aus HNA, DNA, RNA und ANA, hier kam es ebenfalls nur zur Bildung von höchstens Tetrameren.

Als eine Besonderheit der ANA ist noch zu erwähnen, dass die Inkubation von 2-MeImpG an einem „ANA-C<sub>10</sub>“ Templat nach 14 Tagen zur Bildung von G<sub>14</sub>- und nach 28 Tagen von G<sub>25</sub>-Oligomeren führte. Der Grund dafür ist, dass das Sliding bei ANA sehr ausgeprägt ist [101] <sup>11</sup>.

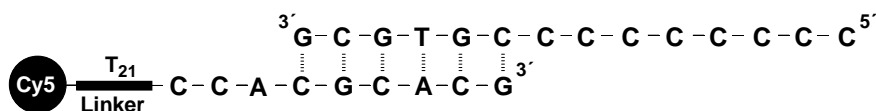


Bild 25: Primer aus [83]

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Göbel zur Oligomerisierung mit D wurde ein neues Testsystem vorgestellt (Bild 25). Es bestand aus einem

<sup>10</sup> An einem PolyC-Templat oligomerisiert 2-MeImpG effizienter als 2-MeImp(dG) [100].

<sup>11</sup> Diese Ergebnisse sind in einem Review zusammengefasst [47]

RNA-Primer, der über einen PolyT-Linker mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 verbunden war (Bild 25 und Bild 26). Die Analytik wurde in einem DNA-Sequencer mittels denaturierender Gelelektrophorese durchgeführt. Die anschließende Detektion erfolgte online durch Anregung des Farbstoffs mit einem lichtintensiven Laser. Das hatte den Vorteil, dass die Verdünnung stark erhöht werden konnte und die Zuordnung der Verlängerungsprodukte erheblich erleichtert wurde. Es war jetzt möglich, 40 Proben parallel zu analysieren [82],[83].

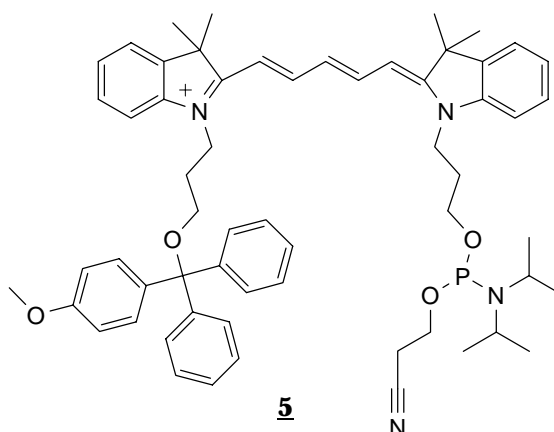


Bild 26: Strukturformel des verwendeten Cy5 –Phosphoramidits **5**

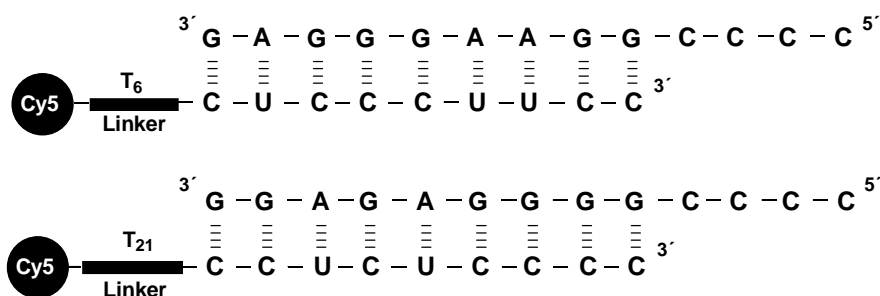


Bild 27: Orthogonales Primerpaar zum Experiment aus Bild 28

Mit diesem Verfahren ließen sich neue Fragestellungen angehen. Ein „homo(dC)“ Templat wurde auf seine Länge untersucht, die es haben darf, um eine ungehinderte Oligomerisierung zu unterstützen. Es zeigte sich, dass bei dC<sub>10</sub> eine sehr effiziente Reaktion abläuft. Aber schon bei dC<sub>12</sub> verringerte sich sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Ausbeute längerer Produkte drastisch [83]. Es war möglich, ein orthogonales Primerpaar zu konstruieren

(Bild 27). Primer A sollte dabei ausschließlich nach der Zugabe von Templat A verlängert werden und Primer B ausschließlich nach der Zugabe von Templat B. Durch eine unterschiedliche Linkerlänge war es möglich, beide Reaktionen simultan zu beobachten. Primer A und Primer B wurden gemeinsam in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dazu fügte man in das erste Gefäß Templat A, in das zweite Gefäß Templat B und in das dritte Gefäß beide Template A und B. Da man bei der Gelelektrophorese nach der Länge der Oligonucleotide auftrennt, erscheinen die Primer durch ihre unterschiedliche Linkerlänge in verschiedenen Zeitfenstern (Bild 28).

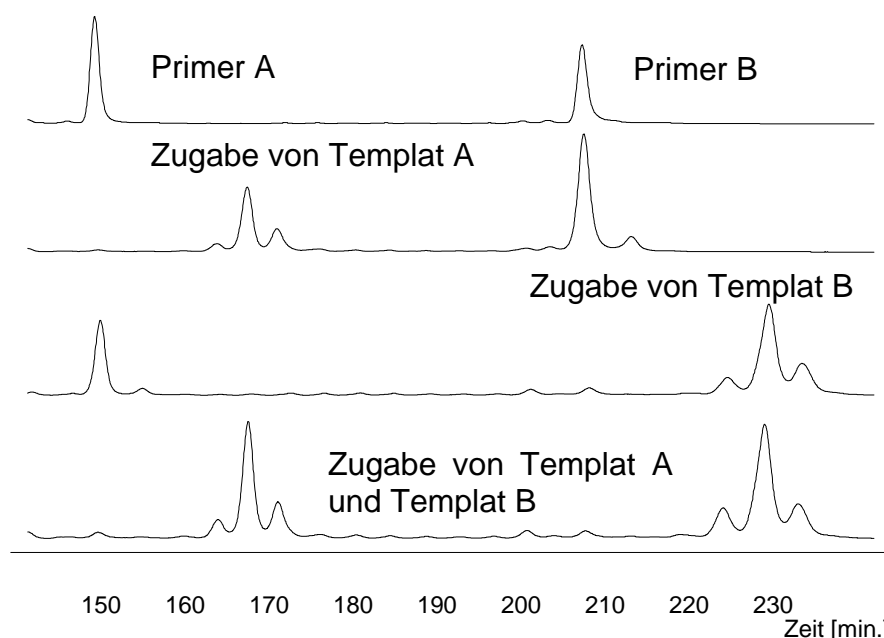


Bild 28: Orthogonale Oligomerisierungsreaktionen aus [83]

Allerdings ergaben sich durch die Vereinfachung der Primer, sie bestanden nur aus Pyrimidinen, neue Schwierigkeiten, die eine effiziente Verlängerung behinderten. Die Zugabe eines zweiten Phosphorimidazolid behinderte den Einbau von 2-MeImpG. Dieses Phänomen war deutlich bei der Verlängerung an einem „homoC“ Templat zu beobachten, wie im Bild 29 zu sehen ist. Wurde bei einem Experiment mit dem oberen Primer Templat Duplex aus Bild 27 nur G zugegeben, erfolgte der Einbau mit nahezu 90 %. Gab man aber ein zweites Imidazolid zu, fiel dieser Wert stets auf unter 70 %. Noch verstärkt war das bei



Templaten zu beobachteten, mit denen die gegenseitigen Primerbindesequenzen aufgebaut werden sollten [102].

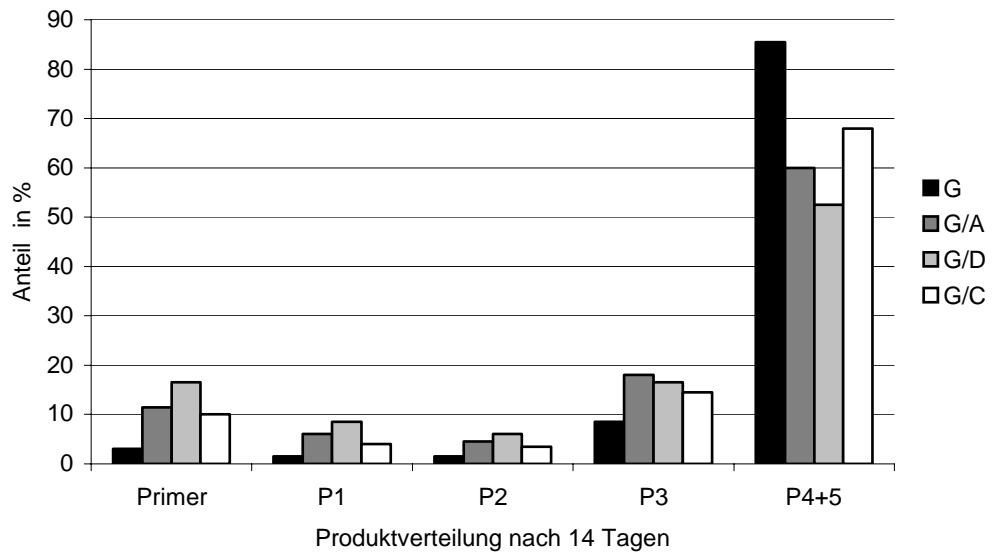


Bild 29: Kreuzinhibierung bei dem „CCUUC“ Homopyrimidin-Primer aus Bild 27 durch zusätzliche Imidazolide

### 3 RNA-Synthese

Die Oligonucleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind nach der Phosphoramidit Methode hergestellt worden [103],[104],[105],[106]. Bei dieser Methode handelt es sich um eine chemische Festphasensynthese, welche die Vorteile einer hohen Kupplungsausbeute und einer schnellen Reaktion der Phosphoramidite ausnutzt.

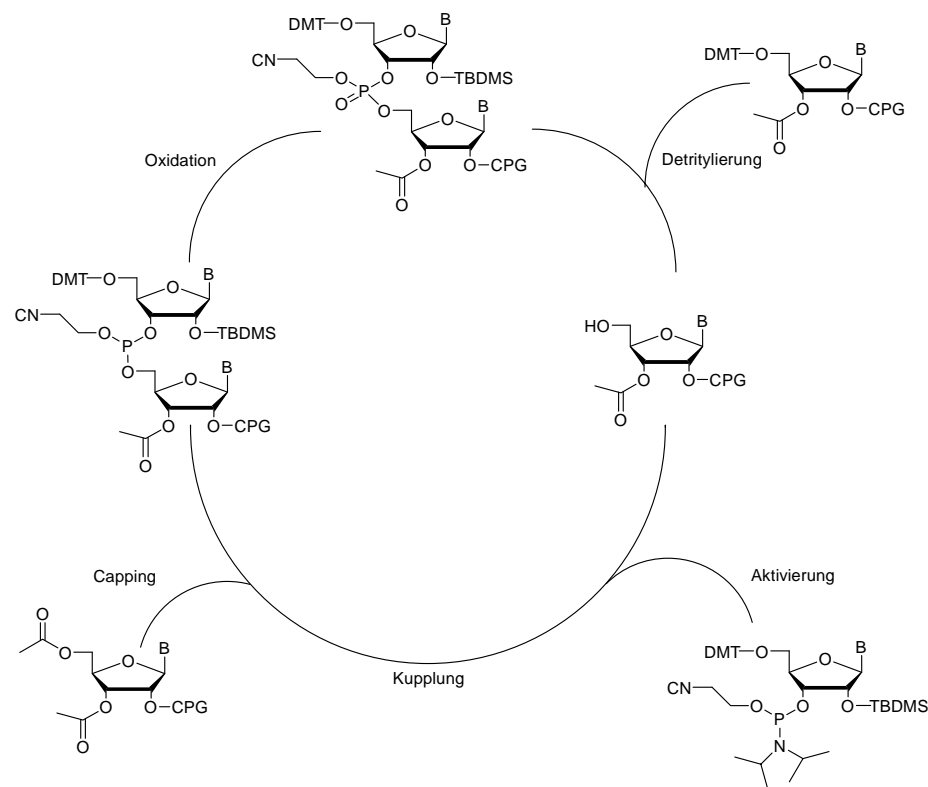


Bild 30: Synthesesyklus der Phosphoramidit-Festphasensynthese

In Bild 30 ist der Reaktionszyklus schematisch dargestellt. Das erste Nucleotid, das am Träger befestigt ist, trägt in 2'-O- oder 3'-O-Position eine Acetyl-Schutzgruppe. Hier ist nur eine Variante als Beispiel gezeigt. In Kapitel 3.2 wird auf die einzelnen Schritte ausführlich eingegangen.

Die für diese Chemie verwendeten Monomere müssen bestimmte Schutzgruppen tragen, um einen linearen Reaktionsweg zu gewährleisten. Auf deren Herstellung soll im folgenden Kapitel eingegangen werden.

### 3.1 Synthese der Monomere

Zur Synthese der geschützten Monomere erfolgt im ersten Schritt die Blockierung der nucleophilen exocyclischen Amino-Funktionen. Das geschieht in den häufigsten Fällen durch basenlabile Acylgruppen, wie sie schon von H. G. Khorana 1964 beschrieben wurden [107]. Bei Guanosin besitzt außerdem die 5'-OH-Schutzgruppe durch die einfache Handhabung und schnelle Abspaltung eine große Bedeutung [108],[109].

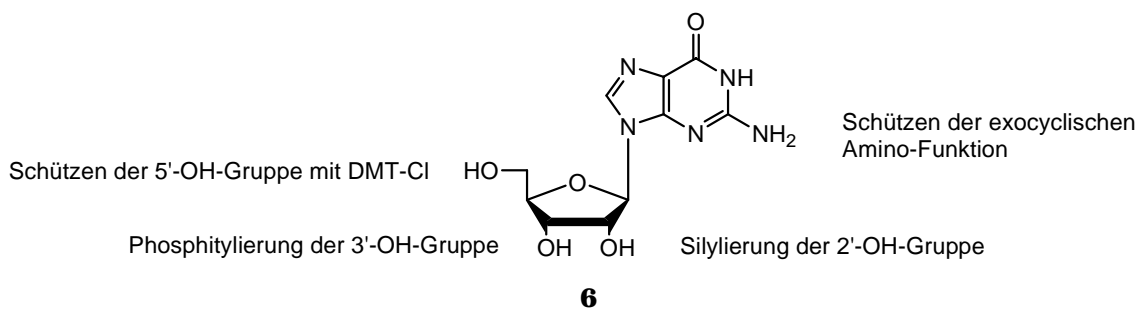


Bild 31: Derivatisierung der Nucleoside für die Phosphoramidit Methode am Beispiel von Guanosin **6**

Zum Schützen des 5'-OH verwendet man nach wie vor die von Khorana beschriebene säurelabile DMT-Gruppe [110]. Sie wird im zweiten Schritt der Synthese eingeführt. Die Abspaltung während des Synthesesyklus wird meistens mit verdünnter TCA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durchgeführt.

Zur Blockierung der 2'-OH-Gruppe im Fall von Ribonucleosiden wird überwiegend die von K. K. Ogilvie 1978 beschriebene TBDMS Gruppe eingesetzt [111],[112]. Sie hat die Eigenschaft, orthogonal zu den säure- oder basenlabilen Schutzgruppen zu sein. Sie kann u.a. mit dem Fluorid-Reagenz  $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$  abgespalten werden [113]. Allerdings besitzt diese Schutzgruppe zwei Nachteile. Erstens entstehen während der Synthese drei Produkte, nämlich zwei Regioisomere und ein bissilyliertes Produkt. Deren Verhältnis kann aber durch

geeignete Reaktionsbedingungen zugunsten des gewünschten Isomers beeinflusst werden [114]. Zum anderen neigt die Schutzgruppe unter basischen Bedingungen, wie sie bei der Phosphitylierung gegeben sind, dazu zu wandern, d. h. das 2'-O-TBDMS Regioisomer kann isomerisieren [115]. Häufige Verwendung findet auch die TIPS-Schutzgruppe. Sie unterbindet durch ihre Größe die Bildung der bissilylierten Produkte [116].

Viele Vorteile bietet die TOM-Schutzgruppe. Durch ihre geringere sterische Hinderung lassen sich die Kopplungszeiten erheblich verkürzen. Der Anteil des gewünschten Isomers lässt sich beträchtlich steigern [117],[118].

Der letzte Syntheseschritt zur Herstellung der Bausteine für die Festphasensynthese besteht in der Einführung der Phosphoramiditgruppe an das 3'-OH. Das sog. „Phosphitylierungsreagenz“, mit dem man diese Reaktion durchführt, besteht aus einem dreiwertigen Phosphor, der mit einer Cyanethoxygruppe (CE) und einer Dialkylaminogruppe substituiert ist. Diese Dialkylaminogruppe dient während der Kupplung nach einer Protonierung als Abgangsgruppe. Meistens wird hier die N,N-Diisopropylaminogruppe verwendet. Geht man zu kürzeren Alkylresten über, erhöht sich zwar die Reaktionsgeschwindigkeit, aber die Phosphoramidite werden dadurch auch immer instabiler [119].

Die Synthese der verschiedenen Bausteine ist ausführlich in der Dissertation von Christian Hartel beschrieben [83]. Deshalb soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

In dieser Arbeit kam nur das als N-Acetyl geschützte Cytidin zum Einsatz, um eine Entschützung mit AMA, was sich im Fall von Diaminopurin als nützlich erwiesen hat, zu ermöglichen [120]. Diaminopurin wurde anders als bei Hartel mit Acetyl-Schutzgruppen anstelle von Benzoyl-Schutzgruppen versehen. Vergleiche zeigten, dass sich dadurch die Kopplungsausbeuten steigern ließen<sup>12</sup>. Obwohl TIPS die bessere Schutzgruppe im Vergleich zu TBDMS ist (keine Wanderung, kein bissilyliertes Produkt), wurde auch TBDMS verwendet, da von TBDMS-Cl große Mengen vorrätig waren.

---

<sup>12</sup> Daten hierzu sind nicht gezeigt.

## 3.2 Synthese der Oligonucleotide

Die Oligonucleotid-Festphasensynthese wurde an einem kommerziellen DNA-Synthesizer durchgeführt. Dieses Verfahren soll hier näher beschrieben werden. Als feste Phase wird meistens controlled pore glass (CPG) verwendet. Das erste Nucleotid ist bei vielen kommerziellen Synthesesäulen über einen Linker schon mit der festen Phase verbunden. Es findet aber auch der sog. Universal Support eine breite Anwendung, der noch nicht mit einem Nucleotid beladen ist und dadurch flexibler eingesetzt werden kann. Die Synthese wird vom 3'- zum 5'-Ende durchgeführt. Dazu muss im ersten Syntheseschritt die säurelabilen DMT Schutzgruppe des ersten Nucleotids oder des Universal Supports mit einer TCA Lösung abgespalten werden. An die nun freie 5'-OH Gruppe wird nach der Aktivierung von dessen Phosphoramiditgruppe durch ein sehr milde Säure das zweite Monomer gekuppelt. Als Aktivator wird u.a. 1H-Tetrazol, p-Nitrophenyltetrazol, N-Ethylthiotetrazol oder 4,5-Dicyanimidazol verwendet [121],[122]. Im folgenden Schritt werden die freien 5'-OH-Gruppen, die keine Kupplung eingegangen sind, mit einem Capping-Reagenz ( $\text{Ac}_2\text{O}$  und 1-Methyl-Imidazol) acetyliert. Zum Schluss des Synthesesyklus wird durch die Reaktion mit Iod der dreiwertige Phosphor zum Phosphat oxidiert. Dieser Zyklus kann anschließend erneut durchlaufen werden. Nach beendeter Synthese erfolgt die Abspaltung des Oligonucleotids von der festen Phase durch die Behandlung mit konz. Ammoniak in EtOH. Eine sich anschließende Inkubation bei 55°C entfernt die basenlabilen Schutzgruppen an den exocyclischen Aminen und die Cyanethoxy-Schutzgruppe am Phosphat.

Wird die Synthese mit Ribonucleotiden durchgeführt, müssen in einem zusätzlichen Schritt die 2'-O-Silyl-Schutzgruppen durch Fluorid-Reagenzien ( $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ ) desilyliert werden. Man bestimmt dann nach einigen Aufreinigungsschritten die Ausbeute der Syntheseprodukte durch UV-Spektroskopie und deren Reinheit durch eine HPLC-Analytik. Die einzelnen Schritte dazu sind detailliert in Kapitel 7.3 aufgeführt.

## 4 Oligomerisierungsexperimente

Die Grundlagen dieser Arbeit zum Thema der nichtenzymatischen Oligomerisierung wurden von Karin Göbel [74], Markus Kurz [77] und Christian Hartel [83] gelegt. Sie sind in Kapitel 2.2 ausführlich beschrieben. Ergänzende Experimente, die diese Ergebnisse abrunden und abschließen, sollen hier vorgestellt werden.

Alle beschriebenen Reaktionen liefen nach einem ähnlichen Schema ab [123]. Primer und Templat wurden in einem Puffer, der  $Mg^{2+}$ -Ionen enthielt, vereinigt und wenige Minuten auf 90°C erhitzt. Um eine Duplexbildung zu garantieren, kühlt man anschließend auf 10°C ab und fügt die entsprechenden 2-Methyl-Phosphorimidazole der Nucleotide (2-MeImpN, N bezeichnet die Basen A, D, G, C und U) zu. Gemäß der Basenpaarung nach Watson-Crick lagerten sich die Monomere am Templat zu einem Doppelstrang an. Die 3'-OH-Gruppen waren dadurch in der Lage, sich durch eine nucleophile Substitution mit einem benachbarten Phosphat kovalent zu verknüpfen. Das 2-Methyl-Imidazol diente dabei als Abgangsgruppe.

Die aktivierten Monomere werden in folgenden entweder einfach als N-Imidazole oder als 2-MeImpN bezeichnet. Wird entweder von Natrium- oder Lithium-Imidazoliden gesprochen, bezeichnet dies das jeweilige Gegenion der aktivierten Monomere. Bei der Abkürzung 2-MeImpN wird das Gegenion in eckigen Klammern nachgestellt (z. B. 2-MeImpG [Na<sup>+</sup>]).

Die Primer werden im Text nach ihrer Bindesequenz benannt. Er besteht in der Regel aus RNA. Der „CCUUC“ Primer bindet also z. B. genau mit dieser Sequenz an die jeweiligen Template. Diese sind aus DNA aufgebaut und werden nach der Sequenz bezeichnet, an der die Polymerisation stattfindet. An einem „CCCCC“ Templat werden also „6G“ eingebaut. Wird im folgenden z.B. vom P6- oder P7 Produkt gesprochen, bezeichnet das den um sechs oder sieben Nucleotide verlängerten Primer. In den meisten Fällen wird am Primer ein Nucleotid mehr eingebaut, als das Templat vorgibt. Dieser Anteil wird zum Wert des vollverlängerten Produkts dazu addiert und im folgenden als

PX+(X+1) bezeichnet. Abweichungen von den Regeln werden besonders erwähnt.

## 4.1 Ausgangssituation

Das Testsystem von Kurz verwendete einen von K. Göbel entwickelten Acridin-markierten Pentamer Primer<sup>13</sup> und variable Template. Die Analytik erfolgte mittels RP-HPLC. Eine ausführliche Beschreibung ist im Kapitel 2.2 zu finden.

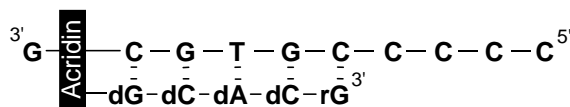


Bild 32: Testsystem nach Göbel mit Acridin gelabelten Primern

Damit konnte u.a. gezeigt werden, dass die Konformation der Duplexe von entscheidender Bedeutung ist. Nur bei in der A-Form vorliegenden Doppelsträngen war eine schnelle und effiziente Oligomerisierungsreaktion möglich. Die Oligomerisierung an Guanosin-reichen Templaten gelang in Abwesenheit von Natrium- oder Kalium-Ionen, da dadurch die sonst zu beobachtende G-Tetradenbildung verhindert werden konnte (Bild 14 in Kapitel 2.2).

Allerdings stieß das HPLC-Systems an seine Grenzen, als höhere Anforderungen an die Auflösung und den Probendurchsatz gestellt wurden. Das führte dann zu der Entwicklung einer neuen Analyse auf der Grundlage der Gelelektrophorese.

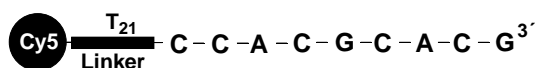


Bild 33: Cy5 markierter Primer nach Hartel, ein Analog zum bewährten „GCACG“ Primer

Die hierbei verwendeten Primer bestanden aus der RNA-Primersequenz, die über einen DNA-Linker mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5<sup>14</sup> verknüpft waren.

<sup>13</sup> Dieser Primer wird auch als der Standard „GCACG“ Primer bezeichnet.

Zur Analyse kam der DNA-Sequencer ALFExpress (*Pharmacia*) zum Einsatz, mit dem 40 Oligomerisierungsreaktionen parallel aufgetrennt und mittels eines Lasers detektiert werden können. Die so gewonnenen Daten stimmten mit denen aus dem HPLC-System überein. Die hohe Nachweisempfindlichkeit erlaubte die Durchführung der Experimente in höherer Verdünnung. Bedingt durch das bessere Auflösungsvermögen war es jetzt erstmals möglich, den Einbau auch an längeren Templaten zu verfolgen. Bei dem Einbau von G an „polyC“ Templaten wurde dabei von Hartel eine kritische Länge des Templates festgestellt. Bestand das Template aus mehr als zehn C-Resten, verschlechterten sich sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Effizienz der Verlängerung deutlich (Bild 34).

Da die Oligomere bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt werden, konnten durch die Verwendung verschieden langer Linker erstmals Oligomerisierungsreaktionen von zwei unterschiedlichen Primern in einem Reaktionsgefäß beobachtet werden (Bild 28 in Kapitel 2.2).

Erfolgreich verlief auch der Ersatz von A durch 2,6-Diaminopurin D. Wurde D entweder im Template oder bei den aktivierten Monomeren anstelle von A verwendet, führte das zu deutlich effizienteren Oligomerisierungsreaktionen. Die bis dahin angenommene Barrieren von zwei oder drei T in einem Template konnte problemlos umgangen werden.

## 4.2 Experimente im Rahmen dieser Dissertation

Die Oligomerisierungsreaktionen dieser Arbeit wurden ausschließlich mit dem DNA-Sequencer analysiert. Die Konzentration der Imidazole entsprach in allen hier vorgestellten Experimenten einem Wert von 50 mM je Imidazol<sup>14</sup>. Zur Probennahme pipettierte man nach bestimmten Zeitabständen 1 µl aus dem

---

<sup>14</sup> Die Formelbilder für die Farbstoffe Acridin und Cy5 sind in Bild 17 und in Bild 26 in Kapitel 2.2 gezeigt.

<sup>15</sup> Bei Hartel wurde die Gesamtkonzentration von 50 mM auf alle verwendeten Imidazole aufgeteilt.



Reaktionsansatz (siehe Kapitel 7.4) in 99  $\mu\text{l}$  Formamid. Zur Durchführung der Analytik verdünnte man 1  $\mu\text{l}$  dieser Lösung mit 10  $\mu\text{l}$  Ladepuffer (Dextran Blau in Formamid), wovon man 8  $\mu\text{l}$  in die Taschen des Gels pipettierte. Nach erfolgter Auftrennung und Detektion der Produkte konnte ihr Anteil über die Alf Auswertungssoftware (*AlleleLinks*) bestimmt werden.

#### 4.2.1 Untersuchungen zur kritischen Länge des Templats

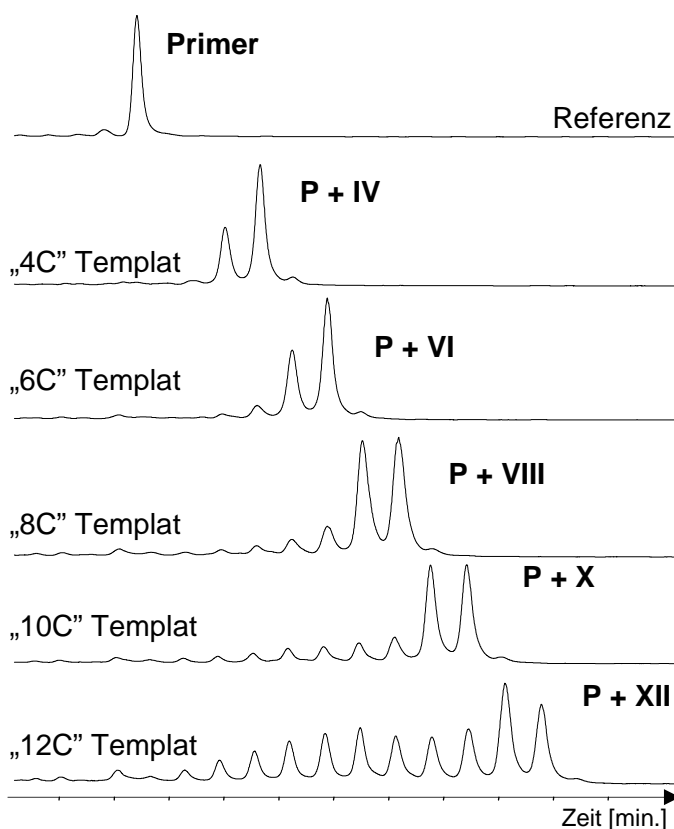


Bild 34: Kritische Länge des Templats

Die Experimente zur kritischen Länge eines Templats wurden mit dem Standard „GCACG“ Primer durchgeführt. Dieser Primer lieferte gut reproduzierbare Ergebnisse und effiziente Verlängerungen, die nicht durch die Verwendung mehrerer Imidazole inhibiert wurden.

Hartel stellte fest, dass ab einer Templat-Länge von „12C“ die Effizienz der Reaktion deutlich abnahm (Bild 34). Das Ziel weiterer Untersuchungen war es zu zeigen, durch welche Veränderung der Reaktionsbedingungen die Ausbeute

an vollverlängerten Produkten und die Geschwindigkeit der Oligomerisierungsreaktionen beeinflusst werden können. Dadurch sollte auf die Ursache der kritischen Länge geschlossen werden.

#### 4.2.1.1 Einbau von G

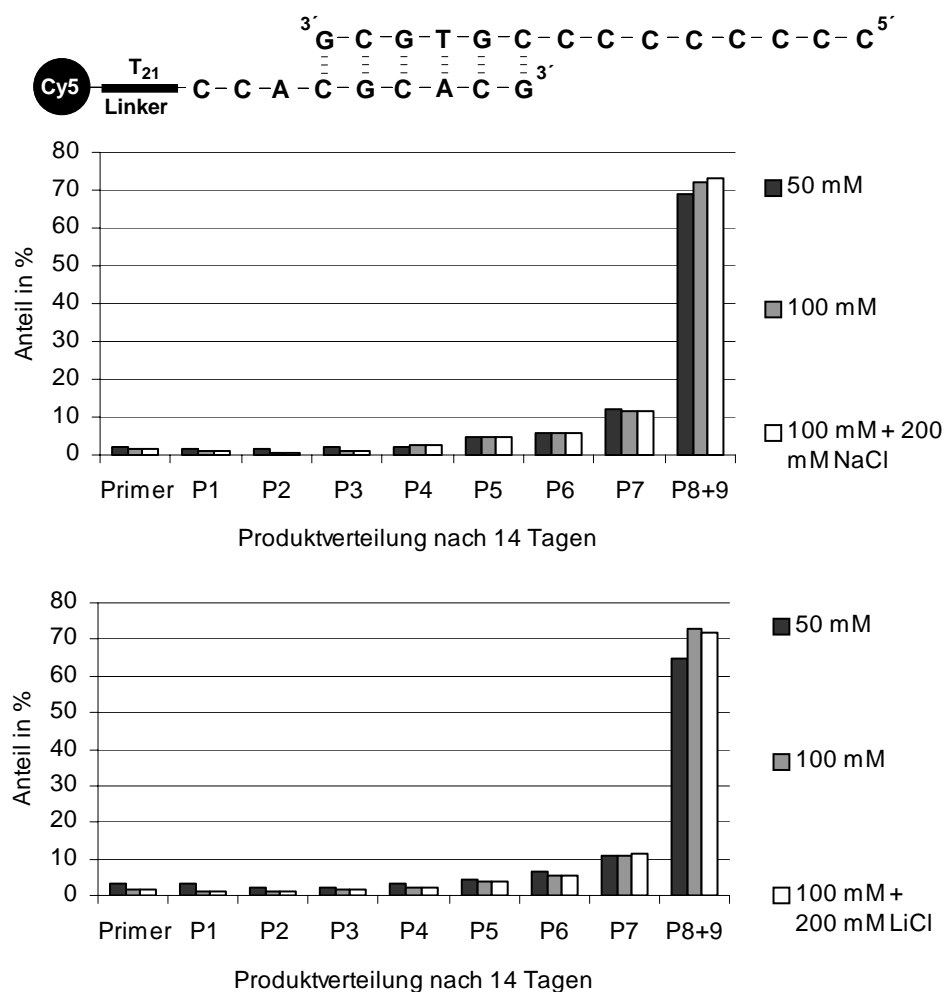


Bild 35: Inkubation mit Primer 14 und dem „8C“-Templat 29 mit Na-Imidazoliden (oben) oder Li-Imidazoliden (unten)

In diesen Experimenten wurde wie bei Hartel mit G-Imidazoliden an Templaten mit einem Überhang aus „6C“, „8C“, „10C“ und „12C“ inkubiert. Durch Variation der Imidazolid-Konzentration, der Gegenionen der Imidazolide und durch die Zugabe zusätzlicher Salze wurde versucht, die Ursache der kritischen Länge zu finden.

Ein möglicher Grund einer ineffizienten Produktbildung kann in der G-Tetradenbildung der Produkte zu finden sein. Diese G-Tetradenbildung tritt bevorzugt mit Natrium oder Kalium Ionen auf und ist bei langen Oligonucleotiden ausgeprägter als bei kurzen. Spielt die Tetradenbildung eine entscheidende Rolle, muss sich die Polymerisation verbessern, wenn man anstelle von Na-Imidazoliden Li-Imidazolide verwendet. Die zusätzliche Zugabe von NaCl oder LiCl kann diesen Effekt noch verstärken. Beim Zusatz von NaCl würde sich die Effizienz der Kettenverlängerung im Gegensatz zum Zusatz von LiCl verschlechtern.

Es zeigte sich aber entgegen diesen Überlegungen, dass weder die Konzentration, noch die Art der Kationen einen sichtbaren Einfluss auf die prozentuale Ausbeute der vollverlängerten Produkte hatten. Wie man z.B. Bild 35 entnehmen kann, unterschied sich die Effizienz der Verlängerung an einem „8C“ Templat nicht, wenn man Na-Imidazolide und Li-Imidazolide miteinander verglich. Eine Verdopplung der Imidazolid-Konzentration von 50 mM auf 100 mM erhöhte leicht die Bildung des vollverlängerten Produkts. Der Zusatz von NaCl zu der Reaktion mit Na-Imidazoliden inhibierte die Effizienz der Reaktion nicht. Im Fall der Zugabe von LiCl zu der Reaktion mit Li-Imidazoliden war auch keine Inhibierung festzustellen. Bei den Experimente mit „6C“, „10C“ und „12C“ Templaten zeigten sich ähnliche Tendenzen (Daten siehe Kapitel 7.4.1.1). Eine Imidazolid-Konzentration von 100 mM erhöhte die Ausbeute wenig im Vergleich zu einer Konzentration von 50 mM. Zusätzliche Salze hatten in allen Fällen einen nur sehr geringen Einfluss. Es spielte kaum eine Rolle, ob Natrium oder Lithium als Gegenion zu den Imidazoliden gewählt wurde.

Der Grund für die kritische Länge der Template liegt also nicht in evtl. Sekundärstrukturen der Oligomere. Das zeigen auch Experimente, bei denen zusätzlich Guanidin zugesetzt wurde (Daten sind nicht gezeigt). Guanidin verhindert die Bildung von Sekundärstrukturen. Die Werte der Produktbildung entsprachen denen ohne Zusätze von Guanidin. Es müssen also andere Ansätze verfolgt werden, um die Ursache der kritischen Länge der Template aufzuklären.

#### 4.2.1.2 Einbau von C

Dieses Kapitel handelt von Experimenten, die den Einbau von C an „homoG“ Templaten untersuchen. Wenn für einen effizienten Einbau der Imidazolide nur die Stärke der Basenpaarung eine Rolle spielte, müssten sich die Verlängerungsprodukte in ähnlichen Ausbeuten wie im umgekehrten Fall aus Kapitel 4.2.1.1 bilden. Ähnlich wie dort inkubierte man an einem Duplex aus Primer und Templaten, die aus einen Überhang von 6, 8, 10 und 12 Nucleotiden bestanden. Man verwendete 2-MeImpC in unterschiedlichen Konzentrationen und es wurde mit unterschiedlichen Gegenionen inkubiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob der Zusatz von Salzen einen Einfluss auf die Effizienz hat.

Allgemein gilt, dass die Reaktionen deutlich schlechter und langsamer verliefen als im zuvor beschriebenen Fall. Zusätzlich zur Stärke der Wasserstoffbrückenbindung spielte also die geringere Stapelwechselwirkung von Pyrimidinen im Vergleich zu Purinen eine entscheidende Rolle. Die Dauer der Reaktion musste deshalb um 14 Tage auf 28 Tage verlängert werden.

Es stellte sich heraus, dass der Einfluss der Imidazolid-Konzentration oder die Natur anwesender Kationen beim Einbau von C eine viel größere Rolle spielte als beim Einbau von G. So ergab sich z.B. bei einem „6G“ Templat nach 28 Tagen und einer Konzentration von 50 mM von 2-MeImpC [Na<sup>+</sup>] eine Bildung des vollständig verlängerten Produkts zu 16%, mit dem entsprechenden Li-Imidazolid dagegen zu 24%. Verdoppelte man die Konzentration auf 100 mM, steigerte sich die Ausbeute bei Na-Imidazoliden auf 34.5%, bei Li-Imidazoliden sogar auf 38.5%. Die Zugabe von LiCl zu der Reaktion mit Li-Imidazoliden hatte keinen erkennbaren Einfluss auf ihre Effizienz (38.5% zu 39.5%). Fügt man dagegen einer Reaktion mit 100 mM Na-Imidazolid 200 mM NaCl zu, verschlechterte sich die Bildung des vollständig verlängerten Produktes von 34.5% auf 22.5% (Daten siehe Kapitel 7.4.1.2).

Führte man die Experimente mit einem Templat aus „8G“ durch, war die Tendenz noch ausgeprägter (Bild 36). Die Ausbeuten waren bei der Verwendung von Imidazoliden mit Lithium als Gegenion in allen Fällen deutlich besser als bei der Verwendung von Natrium als Gegenion. So bildete sich z.B. das vollverlängerte Produkt bei einer Imidazolid-Konzentration von 100 mM zu 22% mit 2-MeImpC [Li<sup>+</sup>] und nur zu 16.5% mit 2-MeImpC [Na<sup>+</sup>]. Die Verdopplung der Konzentration von 50 mM auf 100 mM steigerte die Ausbeute im Fall von Li-Imidazoliden von 9.5% auf 22%. Die Zugabe von 200 mM NaCl zu einem Reaktionsansatz mit 100 mM 2-MeImpC [Na<sup>+</sup>] ließ die Bildung des vollverlängerten Produkts von 16.5% auf 10.5% zurück gehen.

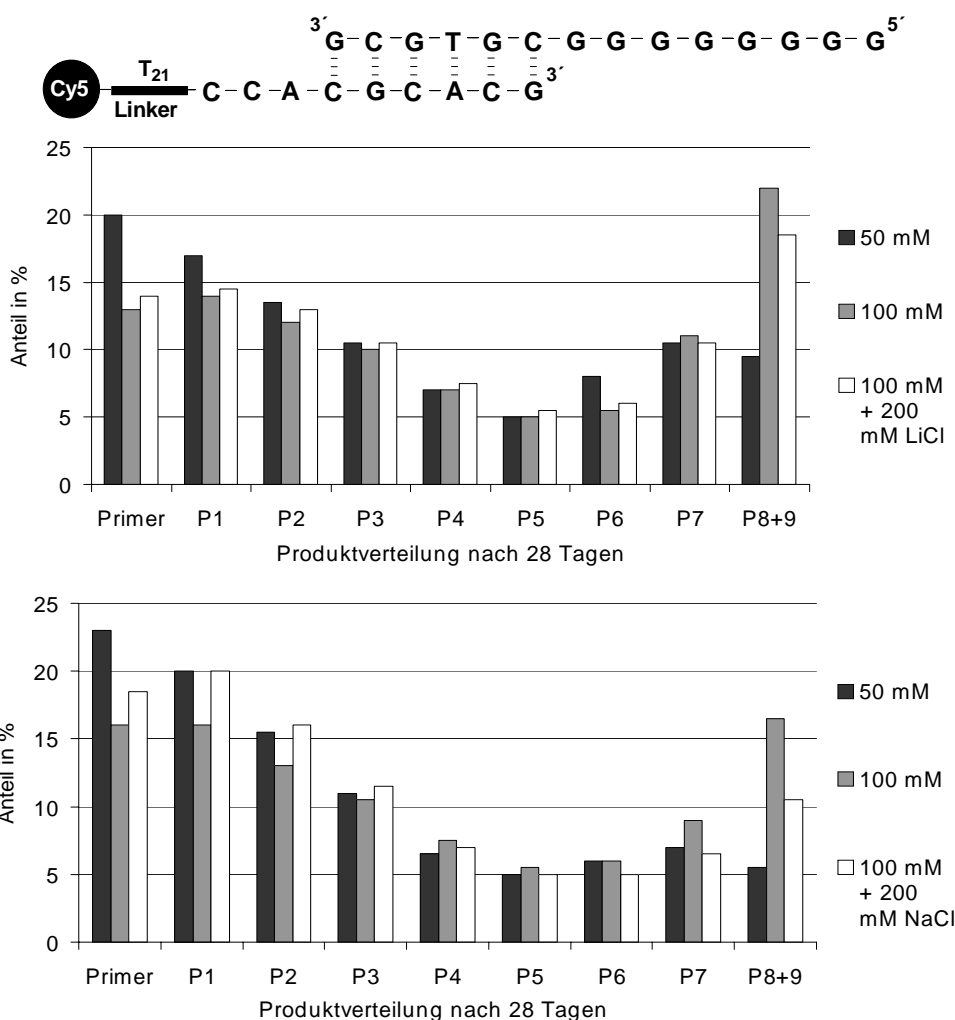


Bild 36: Inkubation mit Primer 14 und dem „8G“ Templat 62 und Na-Imidazoliden (oben) oder Li-Imidazoliden (unten)

Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Untersuchungen mit Templaten aus „10C“ und „12C“ gemacht werden. Imidazolide mit Lithium als Gegenion waren in jedem Fall gegenüber Imidazoliden mit Natrium im Vorteil. Die Verdopplung der Konzentration steigerte die Ausbeute auch hier deutlich (z.B. bei dem „10C“-Templat von 3% auf 11.5% mit Li-Imidazoliden). Der Zusatz von NaCl inhibierte die Reaktion, der Zusatz von LiCl hatte dagegen keinen negativen Einfluss. Bei dem „12C“ Templat ließ sich nach 28 Tagen immerhin ein Anteil von 3% des vollständig verlängerten Produktes detektieren, wenn mit 100 mM 2-MeImpC [Li<sup>+</sup>] inkubiert wurde.

Man kann also zusammenfassend sagen, dass Zusätze von Salz bei Templaten, die nur aus G aufgebaut sind, eine große Rolle spielen. Eine G-Tetradenbildung, die durch Na<sup>+</sup>-Ionen induziert wird, verhindert eine effiziente Kettenverlängerung. Die verschlechterte Stapelwechselwirkung der Pyrimidine führt zu einer weit geringeren Bildung an vollverlängerten Produkten. Das kann zwar teilweise durch eine Verdopplung der Imidazolid-Konzentration ausgeglichen werden. Aber dennoch werden nicht die Werte vom Einbau von Guanosin an einem „homoC“ Templat erreicht.

#### 4.2.1.3 Einbau von G und C

Eine weitere Erklärung für das Phänomen der kritischen Länge der Template kann in ihrer starken Vereinfachung liegen. Template, die nur aus einer Base aufgebaut sind, in dem hier beschriebenen Fall aus „homoG“ oder „homoC“ Sequenzen, könnten über die G-Tetraden hinaus komplexe Strukturen durch Selbstaggregation bilden. Um das zu unterbinden, wurden Experimente mit Templaten durchgeführt, die sowohl G als auch C enthalten. Die Bildung der vollverlängerten Produkte müsste ähnlich effizient verlaufen wie bei der Inkubation an „homoC“ Templaten. Die geringere Stapelwechselwirkung müsste eine untergeordnete Rolle spielen, da sich nur einzelne G in einer „homoC“ Sequenz befinden.

Im ersten Experiment verwendete man das „CGCCC“ Templat. Zum ersten Mal in dieser Arbeit wurde hier ein Fehleinbau von G beobachtet (Bild 37). Von Fehleinbau spricht man, wenn G gegenüber einer anderen Base als C über Nicht-Watson/Crick-Basenpaarung, z.B. über Wobble-Paarung eingebaut wird. Diese Nicht-C-Base wird von G sozusagen „überlesen“. Man kann in Bild 37 sehen, dass zu einem geringen Anteil auch die P2, P3 und P4 Produkte gebildet wurden, wenn man der Reaktionsmischung ausschließlich 2-MeImpG zusetzte.

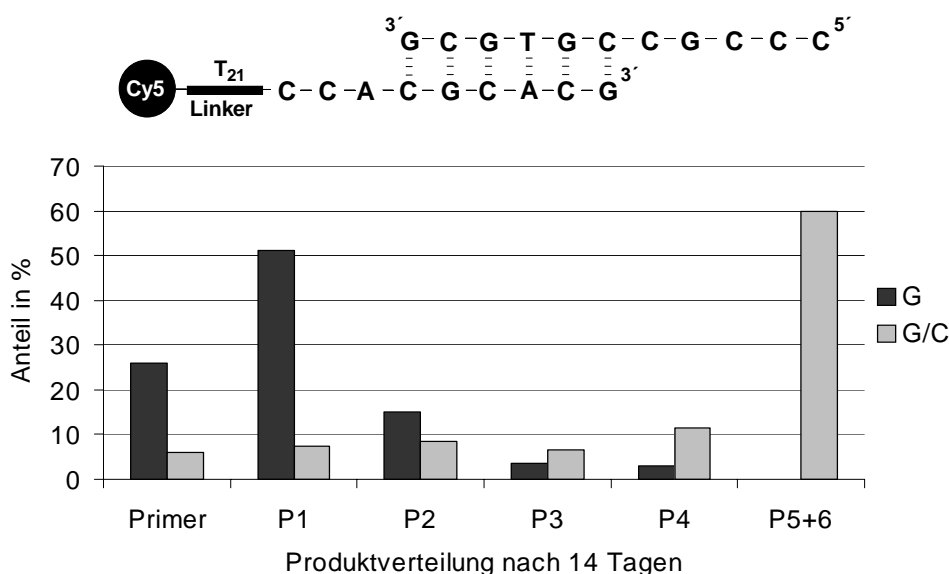


Bild 37: Einbau von G und C an Primer 14 und mit Templat 47

Außerdem ist es bemerkenswert, dass bei Inkubation mit G und C das P5 Produkt nur zu 60% gebildet wurde. In einem vergleichbaren Experiment mit einem „5C“ Templat bildete sich dieses Produkt mit einem Anteil von 85%. Diese deutliche Abnahme kann zum Teil durch das geringere *stacking* der Pyrimidine erklärt werden.

Bei dem Templat aus Bild 38 sollten insgesamt 10 Monomere an der Sequenz „CCGCCGCCG“ eingebaut werden. Nach 14 Tagen bildete sich mit 2-MeImpG das vollverlängerte Produkt nur zu 0.5%, mit 2-MeImpG und mit 2-MeImpC zu 1.5%. Zum Vergleich bildete sich bei einem „10C“ Templat und Inkubation mit 2-MeImpG zu 59.5% das vollverlängerte Produkt, bei einem „10G“ Templat und Inkubation mit 2-MeImpC zu 0.5%. Es muss demnach zu dem verminderten

*stacking* der Pyrimidine ein zusätzlicher Effekt eine Rolle spielen, um diese geringe Ausbeute erklären zu können.

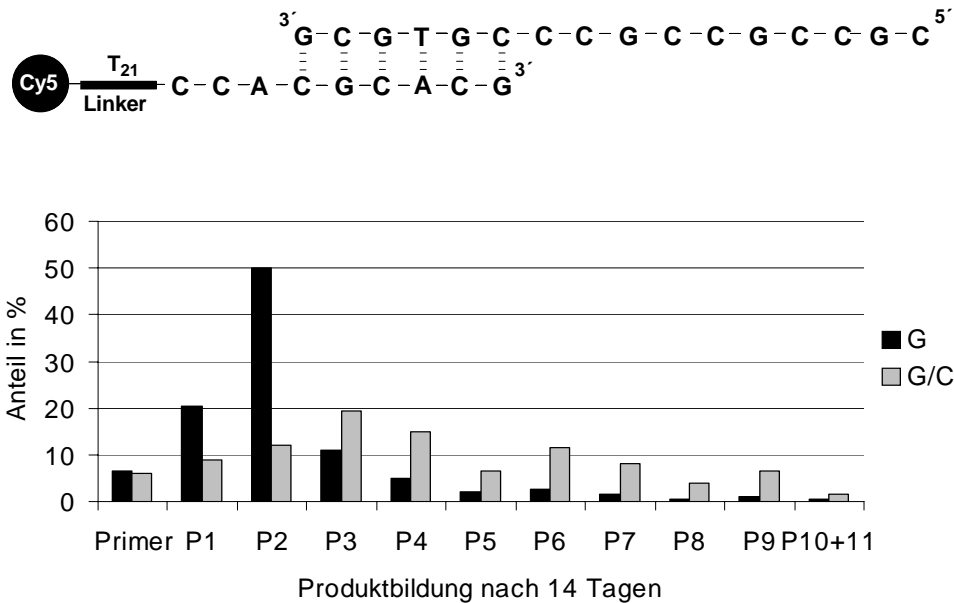


Bild 38: Einbau von G und C an Primer 14 und mit Templat 75

Ein möglicher Grund ist, dass kleine Störungen in einer idealen Duplex-Struktur für dieses negative Ergebnis verantwortlich waren. Homopurin-Stränge bilden nämlich mit Homopyrimidin-Strängen nahezu perfekte und gleichmäßige Doppelhelices aus, in denen die Basen durch *stacking* in eine optimale Wechselwirkung treten können. Befinden sich in einem Homopurin-Strang aber ein oder mehrere Pyrimidin-Basen, wird diese optimale Struktur an dieser Stelle gestört, es liegt keine perfekte Doppelhelix mehr vor. Es ist möglich, dass solche minimalen Störungen einer idealen Struktur eine effiziente Oligomerisierung verhindern können. Das zeigt erneut, wie es schon im Fall der A-Form der Duplexe der Fall war, dass effiziente nichtenzymatische Oligomerisierungen möglichst ideale Rahmenbedingungen benötigen.

#### 4.2.1.4 Einbau von G und D

Die Template, die in den Experimenten dieses Kapitels verwendet wurden, bestehen ausschließlich aus Pyrimidinen. Das hat zur Folge, dass nur Purine mit ihrer höheren Stapelwechselwirkung eingebaut werden müssen. Anders als im Fall der „homoC“ Template wurde hier in bestimmten Abständen ein T



eingebaut. Dabei wurde ausgenutzt, dass das Basenpaar aus D/T annähernd gleich stabil ist wie das Basenpaar G/C (siehe Kapitel 4.2.2). Außerdem sollte durch diese Homo-Pyrimidin Template eine möglichst störungsfreie Bildung der Doppelhelices gewährleistet werden.

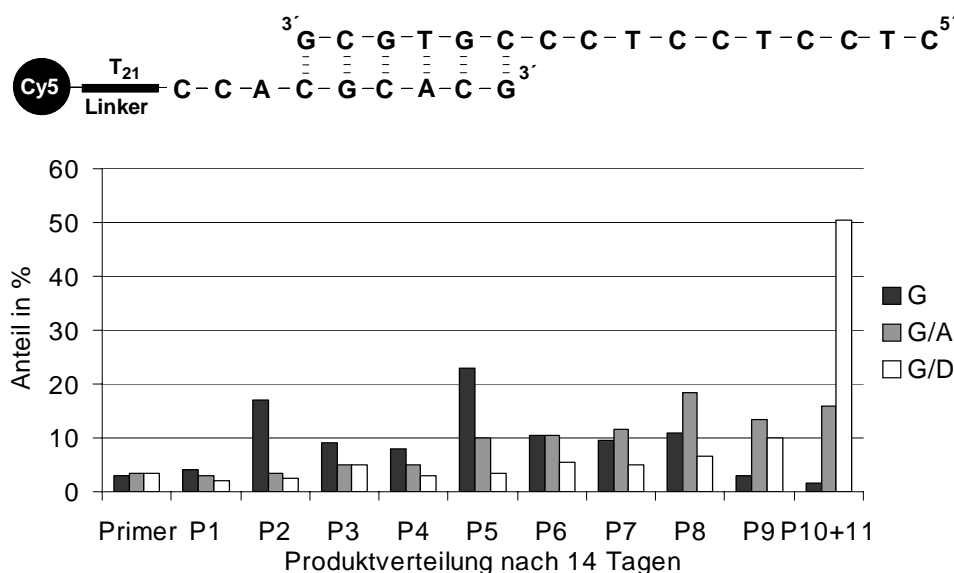


Bild 39: Inkubation am Templat 19 und Primer 14

Wie man Bild 39 entnehmen kann, bildete sich nach 14 Tagen bei Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD zu 50.5% das P10 Produkt<sup>16</sup>. Auffällig ist, dass man auch mit 2-MeImpG allein immerhin zu 1.5% das Endprodukt erhielt. Der Fehleinbau trat hier also deutlicher zu Tage, als im Fall des vorherigen Kapitels. G kann mit T Wasserstoffbrücken nach dem Wobble Typ bilden, was bei G gegenüber von G nicht möglich ist.

Auf den Vergleich des Einbaus von 2-MeImpA mit 2-MeImpD soll im folgenden Kapitel eingegangen werden.

Bei einem etwas längeren Templat aus „CCTCCTCCTCCT“ bildete sich mit 28.5% das P12 Produkt, wenn man 2-MeImpG und 2-MeImpD reagieren ließ<sup>17</sup>.

<sup>16</sup> Unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen bildete sich das P10 Produkt bei einem „10C“ Templat zu 59.5% und bei einem „10G“ Templat zu 0.5%

<sup>17</sup> Zum Vergleich bildete sich bei einem „12C“ Templat das vollverlängerte Produkt zu 32.5%

Bei dem „CCTCCTCCTCCTCC“ Templat, das aus 14 Nucleotiden bestand, bildete sich das P14 Produkt immerhin noch zu 7%.

Man kann also sagen, dass ein ideales Templat möglichst nur aus Pyrimidinen aufgebaut sein muss, um eine reibungslose Oligomerisierung zu ermöglichen. Das ist einmal mit dem höheren *stacking* der Purine und der Bildung der idealen Doppelhelices begründet.

Man kann die Untersuchungen zur kritischen Länge wie folgt zusammenfassen. Es wurde kein offensichtlicher Grund gefunden, warum sich die Effizienz der Oligomerisierung bei Übergang von einem „10C“ zu einem „12C“ Templat deutlich verringerte. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Na<sup>+</sup>-Ionen die Reaktionen negativ beeinflussen. Gemischte Template aus Purinen und Pyrimidinen verhindern eine reibungslose Kettenverlängerung.

#### **4.2.2 Vergleich A und D in Templaten und als aktivierte Imidazolide**

In diesem Kapitel sollen Experimente beschrieben werden, welche die Vorteile des D/T-Basenpaars im Vergleich zum A/T-Basenpaar genauer untersuchen. Wichtige Arbeiten dazu sind schon von Hartel ausgeführt worden. Er zeigte, dass sich die Oligomerisierung deutlich verbessern ließ, wenn man anstelle der natürlichen Base A die nichtnatürliche Base D einsetzte. Sie kann mit T drei anstelle von zwei Wasserstoffbrücken ausbilden (Bild 40).

Es wurde aber schon im Vorfeld erwartet, dass das D/T-Basenpaar etwas instabiler ist als das G/C-Basenpaar. Der Grund hierfür liegt in den sekundären Wechselwirkungen der Wasserstoffbrücken-Donoren und –Akzeptoren, die zwar benachbart sind, aber keine Bindung miteinander eingehen. Der Grund liegt in den elektrostatischen Wechselwirkungen. Diese sind positiv zwischen einem Akzeptor und einem Donor und stabilisieren das Basenpaar. Liegen sich aber zwei Donoren oder zwei Akzeptoren gegenüber, stoßen sie sich ab und destabilisieren die Bindung. Beim G/C-Basenpaar heben sich zwei positive und zwei negative Wechselwirkungen gegenseitig auf. Das D/T-Basenpaar besteht dagegen aus vier negativen Wechselwirkungen, wodurch das Basenpaar destabilisiert wird (Bild 40) [124].

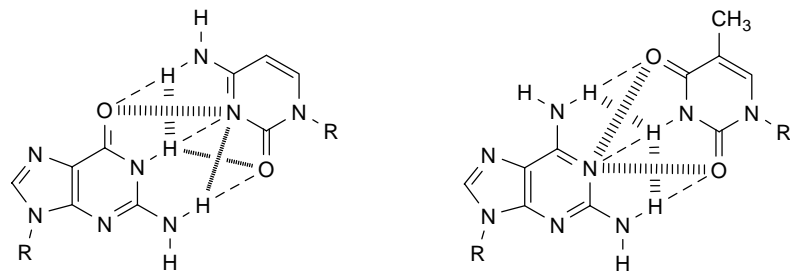


Bild 40: Vergleich G/C- mit D/T-Basenpaar, die dicken gestrichelten Linien bezeichnen die negativen sekundären Wechselwirkung, die dünnen gestrichelten Linien bezeichnen die positiven sekundären Wechselwirkungen.

#### 4.2.2.1 D und A als Monomere

Schon im vorangegangenen Kapitel sind die Vorteile von D sichtbar geworden. Vergleich man in den dort beschriebenen Experimenten D mit A, zeigte sich deutlich, dass eine effektive Oligomerisierung durch A deutlich unterbunden wurde (Bild 39).

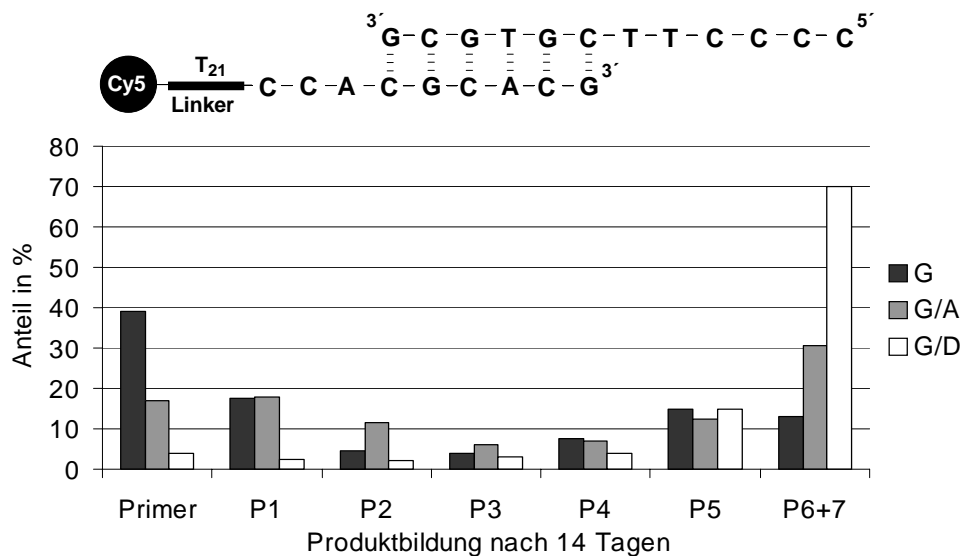


Bild 41: Einbau von G und D am Templat 92 mit Primer 14

Wie schon erwähnt, bildete sich mit 2-MeImpD und 2-MeImpG das P10 Produkt zu 50.5%. Verwendete man aber 2-MeImpA und 2-MeImpG, erhielt man nur zu 16% das vollständig verlängerte Produkt. Bei dem um zwei Nucleotide längere „CCTCCTCCTCCT“ Templat betrug das Verhältnis 28.5% (G/D) zu 5.5% (G/A). Besonders deutlich wurde der Vorteil von D, wenn mehr

als ein T im Templat aufeinander folgten (Bild 41). Bei dieser Reaktion bildete sich nur mit 2-MeImpG zu 13% das P6 Produkt, mit 2-MeImpG und 2-MeImpA zu 30.5% und mit 2-MeImpG und 2-MeImpD zu 70%. Fügte man im Templat ein weiteres T ein („TTTCCC“) ergab sich mit 2-MeImpG ein Wert von 0.5%, mit 2-MeImpG und 2-MeImpA von 2% und mit 2-MeImpG und 2-MeImpD von 60% für das vollverlängerte Produkt. Bei einem Templat, dass nur aus „6T“ bestand („TTTTTT“), konnte man nur eine Produktbildung detektieren, wenn mit 2-MeImpD inkubiert wurde. Hier erhielt man zu 10% das gewünschte Produkt.

#### 4.2.2.2 D und A im Templat

Befand sich D im Templat und inkubiert man mit 2-MeImpU, kam deutlich zum Tragen, dass U im Vergleich zu C eine noch geringere Neigung hat, Stapelwechselwirkungen einzugehen. Deshalb waren in diesem Fall keine großen Reaktionsausbeuten zu erwarten. Befand sich A anstelle von D im Templat, führte die schwachen Wasserstoffbrückenbindungen und die geringe Stapelwechselwirkung von U zu keiner nennenswerten Produktbildung.

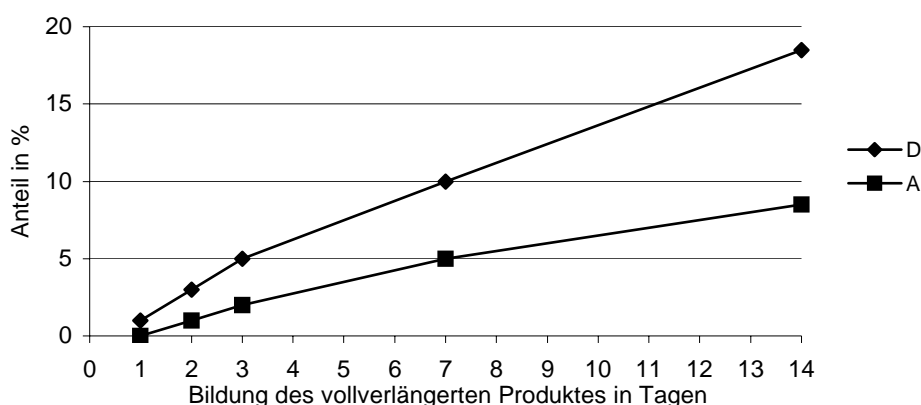


Bild 42: Einbau von 2-MeImpU und 2-MeImpG an den Templat 89 und Templat 95

Wie Bild 42 zu entnehmen ist, bildete sich mit dem „DCCC“ Templat nach 14 Tagen Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpU zu 18.5% das vollverlängerte Produkt. Bei dem „ACCCC“ Templat erhielt man mit 2-MeImpG und 2-MeImpU einen Wert von 1.5%. Inkubierte man nur mit 2-MeImpG allein, ergab sich im Fall des „DCCC“ Templats ein Wert von 1.5%, im Fall des „ACCCC“ Templats von 4%. Bei zwei aufeinander folgenden D oder A im Templat waren die

Ausbeuten noch deutlich geringer. Bei „DDCCC“ ergab sich, dass das P5 Produkt zu 10% gebildet wurde, bei „AACCCC“ nur zu 2%, in beiden Fällen wurde mit 2-MeImpG und 2-MeImpU inkubiert. Ließ man an einem Templat aus „6D“ („DDDDDD“) 2-MeImpU reagieren, erhielt man nur zu 2.5% das P2 Produkt.

### 4.2.3 Einbau gegenüber random-Sequenzen

Bei diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob auch an Templaten, die nicht aus einer genau definierten Sequenz bestanden, eine Primerverlängerung stattfinden kann. Diese Voruntersuchungen können zur Beantwortung der Frage dienen, ob sich durch einen evolutiven Prozess aus vielen Sequenzen bestimmte Sequenzen anreichern können (siehe Kapitel 4.2.9).

#### 4.2.3.1 Einbau gegenüber [C/T]-Zufallspositionen

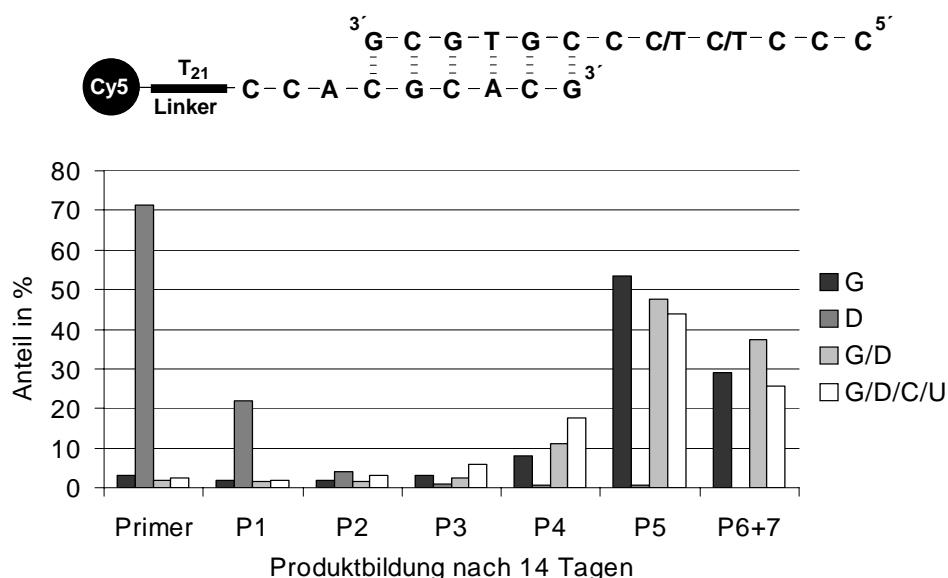


Bild 43: Zufallseinbau an [C/T] mit Primer 14 und Templat 53

Die ersten Experimente zu diesem Thema wurden mit Templaten durchgeführt, die an einer oder mehreren Stellen in einer „homoC“ Sequenz zusätzlich die Zufallssequenz [C/T] enthielten.

Wie die Ergebnisse zeigen, führte die Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD zu den besten Ergebnissen. Aber auch in Fällen, in denen nur mit 2-

MeImpG inkubiert wurde, bildeten sich in guten Ausbeuten die vollverlängerten Produkte. Dabei spielte auch die Position der Zufallsstelle im Templat eine große Rolle. Befand sie sich direkt im Anschluss an die Primerbindestelle erfolgte ein größerer Fehleinbau als wenn sich zwischen Primerbindestelle und der Stelle der Zufallssequenz ein weiteres C befand. Im ersten Fall bildete sich nach einem Tag zu 55% das vollverlängerte Produkt und nach 14 Tagen zu 84%. Im zweiten Fall bildete sich nach einem Tag das vollverlängerte Produkt nur zu 26% und nach 14 Tagen zu 63.5%.

Fügte man zusätzlich zu 2-MeImpG und 2-MeImpD auch noch die aktivierten Monomere 2-MeImpU und 2-MeImpC zu, verschlechterten sich die Werte um wenige Prozentpunkte.

#### 4.2.3.2 Einbau gegenüber [A/C/G/T]-Zufallspositionen

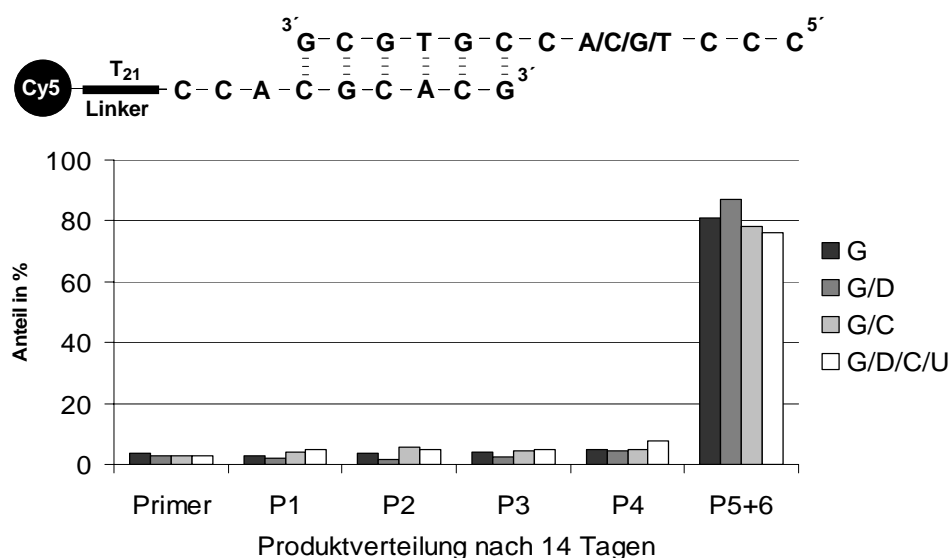


Bild 44: Einbau an der Zufallsposition [A/C/G/T] mit Primer 14 und Templat 54

Als Erweiterung der im vorherigen Kapitel beschriebenen Experimente wurden hier Template verwendet, bei denen sich an einer oder mehreren Stellen in einer „homoC“ Sequenz die Zufallssequenz [A/C/G/T] befand. Die besten Ergebnisse lieferte auch hier die Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD, gefolgt von der Inkubation ausschließlich mit 2-MeImpG. Verwendete man die Imidazolide der vier Basen G,D,C und U war die Bildung des vollverlängerten Produkts geringer (Bild 44).

Etwas anders stellte sich der Fall dar, wenn die Zufallssequenz nicht in einer „homoC“ Sequenz eingebettet war (Bild 45). Hier ergab die Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD (9.5% vollverlängertes Produkt) oder mit 2-MeImpG, 2-MeImpD, 2-MeImpC und 2-MeImpU (10% vollverlängertes Produkt) vergleichbare Ergebnisse. Inkubierte man nur mit 2-MeImpG allein, bildete sich das vollverlängerte Produkt in deutlich geringeren Ausbeuten (2.5%).

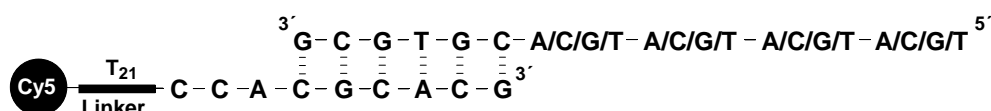


Bild 45: Templat 79 mit vier Zufallspositionen aus A/C/G/T mit Primer 14

#### 4.2.4 Vergleich von DNA- und RNA- „GCACG“ Primer

Aus den Experimenten mit den Acridin-markierten Primern ging schon hervor, dass sich bessere Ergebnisse erzielen ließen, wenn der Primer aus RNA und das Templat aus DNA aufgebaut war. Hybride aus RNA und DNA liegen im Duplex in der A-Konformation vor. Diese Konformation ist für eine effiziente Kettenverlängerung unerlässlich.

Tabelle 1: Vergleich DNA und RNA Primer 20 und 14

Templat und Imidazole	DNA-Primer	RNA-Primer
„6C“ mit G	66%	80%
„8C“ mit G	51%	65%
„10C“ mit G	41%	59.5%
„12C“ mit G	19%	32.5%
„CCTCCTCCTC“ mit G/D	14.5%	50.5%
„CCTCCTCCTCCT“ mit G/D	12%	28.5%
„C-[C/T]-[C/T].CCC“ mit G/D	22.5%	37.5%
„C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T].-CCC) mit G/D“	18.5%	57%

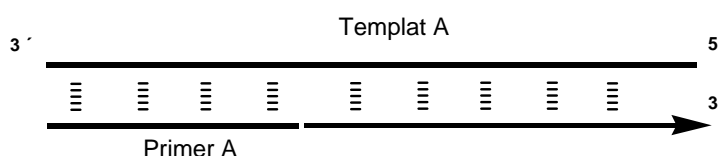
Bestehen aber der Primer und Templat aus DNA, bilden sie einen Duplex in der B-Konformation. Erst durch den Einbau von Ribonucleotiden lagert sich der Duplex langsam in die A-Konformation um. Die ersten Schritte der Oligomerisierung verlaufen dadurch also stark verlangsamt.

Der hier angestellte Vergleich zwischen einem RNA- und einem DNA-Primer, dessen terminales Nucleotid ein Ribo-Baustein war, bestätigte die schon

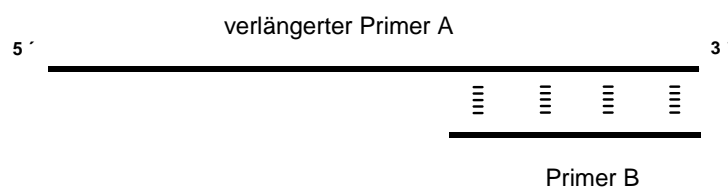
bekannten Ergebnisse. Sie sind in Tabelle 1 zusammengefasst. In allen Fällen lieferte der RNA-Primer höhere Ausbeuten am vollverlängerten Produkt als der DNA-Primer. Die große Wichtigkeit der A-Konformation findet durch sie eine erneute Bestätigung.

#### 4.2.5 Suche nach einem orthogonalem Primerpaar für die nichtenzymatische PCR

##### 1. Schritt: Templat-kontrollierte Verlängerung von Primer A



##### 2. Schritt: Duplex-Trennung und Zugabe von Primer B



##### 3. Schritt: Verlängerung von Primer B

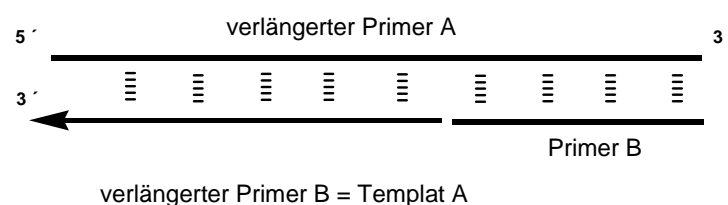


Bild 46: Schema eines nichtenzymatischen PCR Experiments nach Hartel

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation war die Etablierung eines nichtenzymatischen PCR-Experiments. Dafür sollte ein Primer A an einem Templat A so verlängert werden, dass dabei wenigstens die Bindesequenz für einen Primer B aufgebaut wird. Der vollverlängerte Primer A dient dann in einem zweiten Schritt als Templat B für die Rückreaktion mit einem Primer B. Wird Primer B verlängert, ist seine Sequenz identisch mit der von Templat A, die Information wurde also erfolgreich übertragen. Der vollverlängerte Primer B



kann erneut einen zweiten Zyklus durchlaufen, indem er als Bindestelle für Primer A dient.

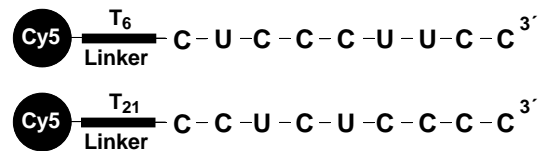


Bild 47: Orthogonale Homopyrimidin-Primer (Primer 15 und Primer 16)

Konstruiert man das Templat A so, dass sich zwischen der Bindestelle für Primer A und der komplementären Bindestelle für Primer B eine Zufallssequenz befindet, kann ein nichtenzymatisches PCR Experiment als Selektionsexperiment dienen (Bild 50). Im Anschluss an die Hin- und Rückreaktion kann man durch ein geeignetes Analyseverfahren feststellen, welche Nucleotide komplementär zur Zufallssequenz eingebaut worden sind.

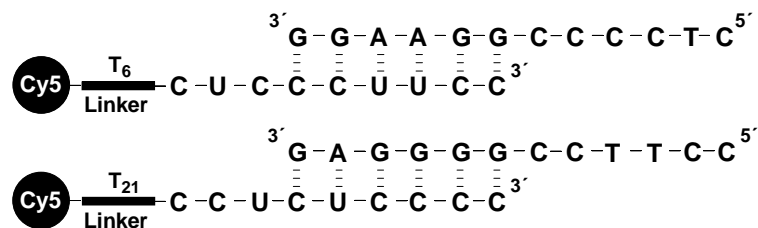


Bild 48: Aufbau der gegenseitigen Primerbindesequenz (Primer 15 mit Templat 50, oben, und Primer 16 mit Templat 51 unten)

Um die PCR Experimente durchzuführen, muss ein komplementäres Primerpaar eingesetzt werden, das sich in der Sequenz der Primer unterscheidet. Bei zwei identischen Primern würden die zugehörigen Template palindromische Duplexe bilden, und so nicht mehr als Templat fungieren können. Die zweite Forderung ist, dass ein Primer A nicht mit einem Templat B verlängert werden darf und umgekehrt. Als drittes Kriterium ist zu fordern, dass beide Primer sich ausreichend durch unterschiedlich lange Linker in ihrem Laufverhalten bei der Gelelektrophorese unterscheiden. Dadurch können sie in einer Gelspur beobachtet werden.

Hartel zeigte in seinen Arbeiten, dass sich der Standard „GCACG“ Primer nicht als ein Partner für ein orthogonales Primerpaar eignet. Die benötigte Bindesequenz „CGUGC“ ließ sich nicht durch eine nichtenzymatische

Oligomerisierung aufbauen. Deshalb war es nötig, die Sequenzen der Primer so zu wählen, dass höchstens zwei unterschiedliche Nucleotide eingebaut werden müssen. Da außerdem bekannt war, dass Purine effizienter als Pyrimidine eingebaut werden, wurden zwei 9mer Homopyrimidin-Primer mit unterschiedlich langen Linkern konstruiert. Die Orthogonalität dieser Primer wurde in Reaktionen zum Einbau von „4C“ mit den jeweiligen Templaten bewiesen (Bild 28 in Kapitel 2.2).

Allerdings scheiterte der Versuch, die Bindesequenz des jeweils anderen Primers aufzubauen. Denn durch das Zufügen eines zweiten Imidazolids wie z.B. 2-MeImpD trat ein bis dahin nicht bekanntes Phänomen auf. Der Einbau von G wurde nämlich durch 2-MeImpD inhibiert, ein Verhalten das als Kreuzinhibierung bezeichnet wurde. Später stellte sich heraus, dass Zusätze von 2-MeImpD auch bei Reaktionen zur Inhibierung führten, bei denen mit diesen Primern „4G“ an einer „homoC“ Sequenz eingebaut werden sollten. Um dem zu entgehen galt es, zwei neue orthogonale Primer zu finden, die diese Kreuzinhibierung nicht aufwiesen. Außerdem sollten sie beim Aufbau der anderen Bindestelle in ausreichenden Ausbeuten das vollverlängerte Produkt liefern.

Für die Rückreaktion sollte eine minimale Bindelänge von fünf Nucleotiden gewährleistet sein. Da das letzte Nucleotid stets in geringerem Maße eingebaut wird, sollten die Primer aus sechs Nucleotiden aufgebaut sein.

Zusätzlich zu den von Hartel schon bekannten „CCUUCC“ und „CUCCCC“ Primern wurden drei weitere Primer synthetisiert, deren Sequenzen nach den folgenden Kriterien ausgewählt wurden:

- Die Primer sollten möglichst nur aus G und C bestehen, da das G/C-Basenpaar den effizientesten Einbau gewährleistet.
- Die Primer sollten aus möglichst vielen Pyrimidinen aufgebaut sein, da zum Aufbau einer Primerbindesequenz dann nur Purine eingebaut werden müssen.
- Die Primersequenz sollte mit einem G enden, da sich das als vorteilhaft für die nichtenzymatische Oligomerisierung erwiesen hat.

Ein Primer kann nicht alle diese Kriterien gleichzeitig erfüllen. Die folgenden drei Sequenzen wurden aber so gewählt, um dem Ideal möglichst nah zu kommen.

- Der Primer „CCGCC“ bestand nur aus G und C und bildete stabile Duplexe mit den zugehörigen Templaten. Seine Bindesequenz sollte sich effizient aufbauen lassen. Allerdings besteht er nur aus fünf Nucleotiden.
- Der Primer „CCCCC“ bestand nur aus der Pyrimidin-Base C. Zum Aufbau der Bindesequenz muss nur das effizienteste Nucleotid 2-MeImpG eingebaut werden.
- Der Primer „CCCCG“ bestand nur aus G und C und endet mit einem G.

Mit diesen jetzt fünf Primern wurden nun systematisch Oligomerisierungsexperimente durchgeführt. Diese hatten das Ziel zu untersuchen, ob sich die Bindesequenz eines jeweiligen orthogonalen Partners aufbauen ließ. Ein Primer sollte weiterhin möglichst keine Kreuzinhibierung aufzeigen. Deshalb wurde gezielt auch beim Einbau von G an einer „homoC“ Sequenz ein zusätzliches aktiviertes Monomer zugefügt. Als dritter wichtiger Punkt wurde überprüft, ob sich die Primer zum Kopieren einer Zufallssequenz eignen (Kapitel 4.2.3 und Kapitel 4.2.5.1). In den folgenden Kapiteln werden die Eigenschaften der Primer näher beschrieben.

## 4.2.5.1 „CCUUC“ Primer 15

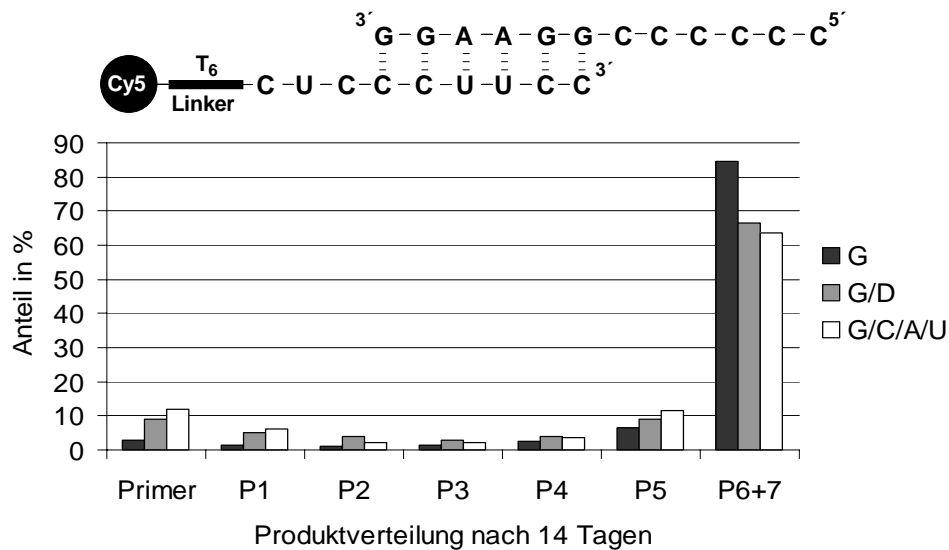


Bild 49: Einbau von G an Primer 15 mit Templat 18

Zusätzlich zu den schon durchgeführten Experimenten sollen hier ergänzende Untersuchungen vorgestellt werden, in denen der Primer 15 zum Aufbau anderer Bindesequenzen oder zur Kettenverlängerung an Zufallspositionen eingesetzt wurde.

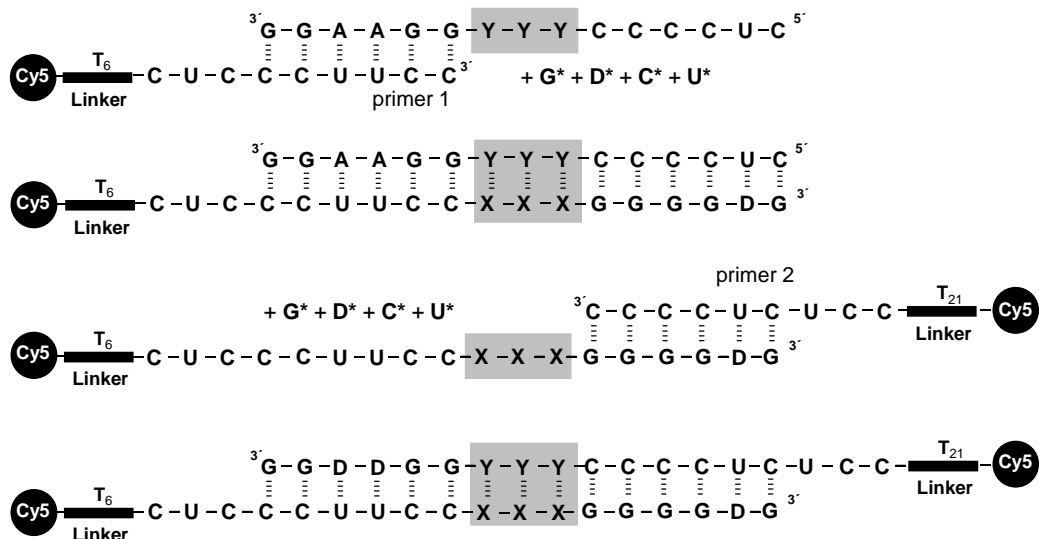


Bild 50: Beispiel für ein Selektionsexperiment

Das Experiment aus Bild 49 sollte zeigen, ob sich durch den Einbau von 2-MeImpG die Bindestelle für einen „6C“ Primer aufbauen lässt. Der Einbau von

„6G“ gelang mit über 80%. Zusätze von 2-MeImpD oder 2-MeImG, 2-MeImpC und 2-MeImpA verringerten die Bildung um nahezu 20%, die Kreuzinhibierung war hier stark ausgeprägt. Der Wert erschien aber ausreichend hoch zu sein, um sich als orthogonaler Partner zu einem „CCCCC“ Primer zu eignen.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich der Primer 15 auch für ein Selektionsexperiment eignete. Von einer Selektion spricht man, wenn sich aus einer zufälligen Sequenz bestimmte Sequenzen anreichern. Dazu wurde zwischen den Primerbindestellen an einer oder mehreren Positionen sog. Zufallssequenzen eingefügt. Nach einem mehrmaligen Durchlaufen eines PCR Zyklus kann sich so eine Selektion zeigen (Bild 50). Zuerst musste man aber untersuchen, ob sich der Primer an solchen Templaten denn effizient verlängern ließ.

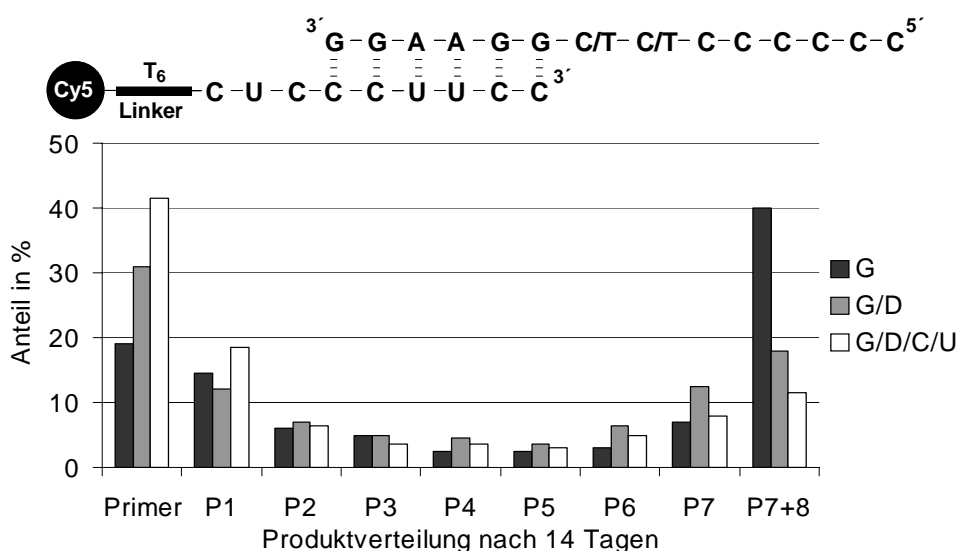


Bild 51: Einbau an Zufallssequenzen C/T mit Primer 15 und Templat 67

In einem ersten Experiment wurde in einem Templat nach der Sequenz „GGAAGG“ an einer Stelle eine Zufallsposition aus den Basen C und T eingefügt. Das vollverlängerte Produkt bildete sich mit 2-MeImG und 2-MeImpD in guten Ausbeuten (30.5 % nach 14 Tagen, siehe Kapitel 7.4.3.4). Im nächsten Schritt erweiterte man das Templat um eine zusätzliche Zufallspositionen (Bild 51). Dabei zeigte sich, dass man die besten Ergebnisse erhielt, wenn man allein mit 2-MeImpG inkubierte. Hier bildete sich das vollverlängerte Produkt zu 40%. Inkubierte man aber zusätzlich mit 2-MeImpD,

fiel der Wert um mehr als die Hälfte. Waren die vier Imidazolide 2-MeImpD, 2-MeImpG, 2-MeImpC und 2-MeImpU zugegeben worden, betrug der Wert des vollständig verlängerten Produkts gerade noch 11.5%. Die Kreuzinhibierung machte sich hier sehr störend bemerkbar. Dass der Wert für G allein so hoch ist, war mit der Wobble Paarung zu begründen. Wenn nur Watson-Crick Bindungen berücksichtigt werden, dürfte sich nämlich in diesem Fall das P8 Produkt nur zu einem Anteil von höchstens 25% bilden. Rechnerisch fand hier ein Fehleinbau von 15% von G gegenüber T statt.

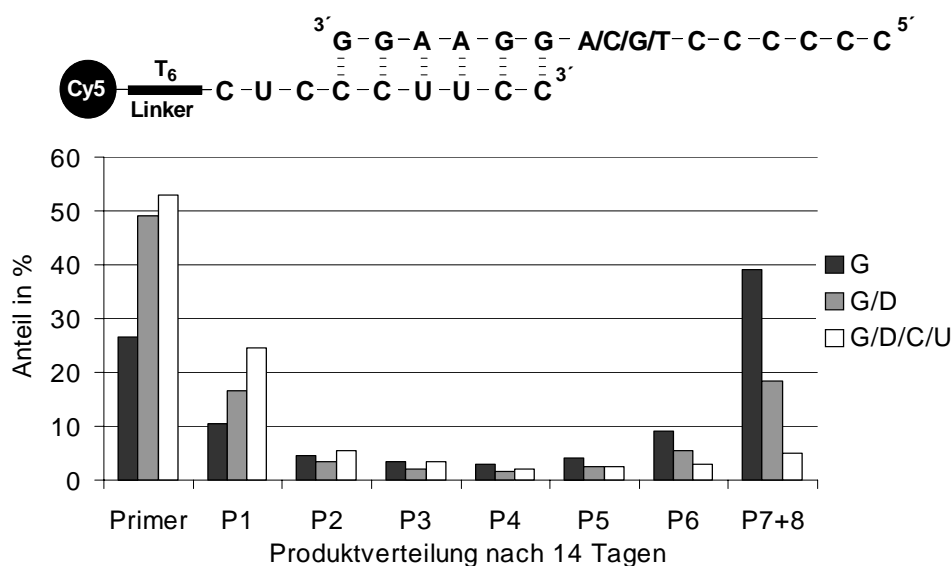


Bild 52: Einbau an Zufallssequenzen aus A/C/G/T mit Primer 15 und Templat 71

In dem folgenden Experiment wurde die Zufallsposition um zwei auf vier Basen erweitert (Bild 52). Die Resultate entsprachen in ihrer Tendenz den vorhergehenden. Die Inkubation mit 2-MeImpG allein lieferte wieder die besten Ergebnisse, gefolgt von denen bei der Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD. Am Schlechtesten verlief auch hier der Einbau, wenn man alle vier Imidazolide einsetzte.

## 4.2.5.2 „CUCCCC“ Primer 16

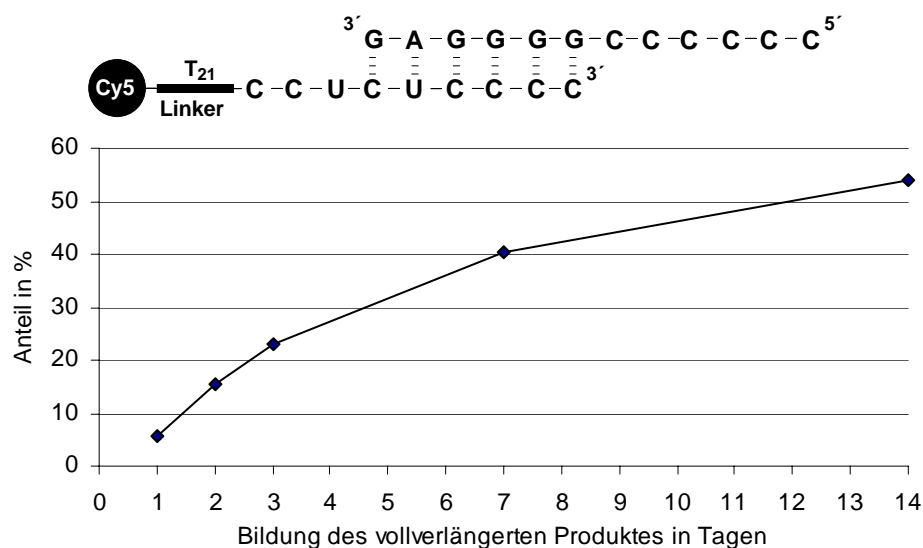


Bild 53: Einbau von G an Primer 16 mit Templat 60

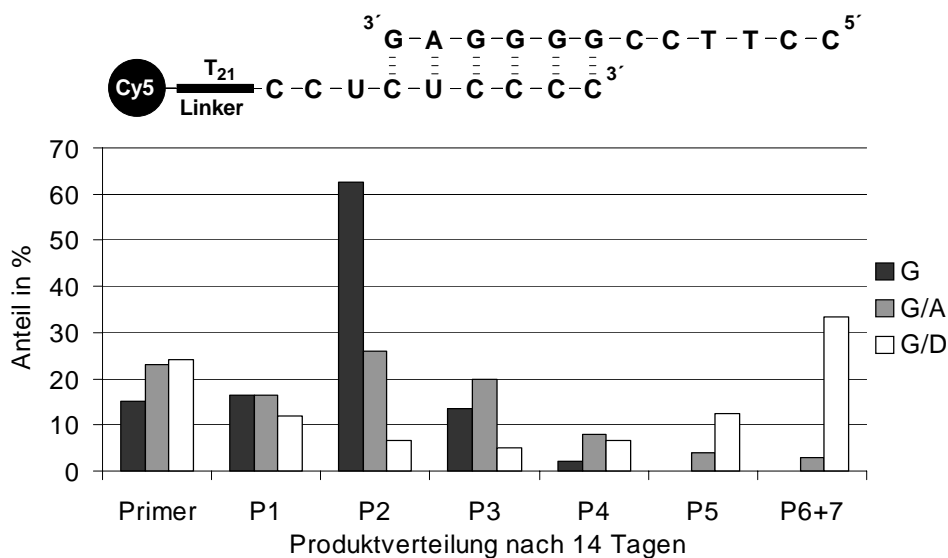


Bild 54: Einbau von G, D/A oder G/D an Primer 16 mit Templat 51

Bei diesem Primer 16 handelt es sich um den zweiten Primer des orthogonalen Primerpaars aus Kapitel 4.2.5. In dem Experiment aus Bild 53 wurde getestet, ob sich der Primer zum Aufbau der Bindesequenz für einen Primer „CCCCC“ eignet. In dem Diagramm ist dargestellt, dass sich nach 14 Tagen das P6 Produkt zu 54% bildete.

In einem weiteren Experiment testete man den Aufbau der Bindesequenz für den Primer „CCUUC“. Dieses Experiment war zwar schon von Hartel durchgeführt worden, allerdings halbierte er die Konzentration der Imidazolide auf jeweils 25 mM. Hier kamen sie mit der Konzentration von 50 mM je Imidazolid zum Einsatz. Die Ergebnisse sind in Bild 54 dargestellt. Man sieht, dass es hier nur im Fall von 2-MeImpG und 2-MeImpD zu befriedigenden Ausbeuten kam, es bildete sich das vollständig verlängerte Produkt zu 33.5%.

#### 4.2.5.3 „CCGCC“ Primer 13

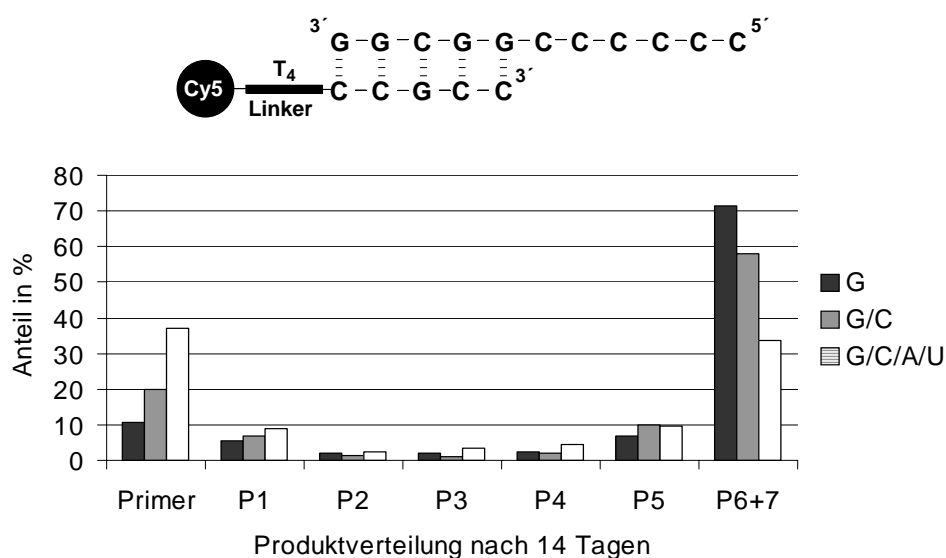


Bild 55: Einbau von G an Primer 13 und Templat 17

Die Wahl der Sequenz dieses Primers beruhte auf der Überlegung, dass sich die Bindesequenz für einen Primer dann am Besten aufbauen lässt, wenn er ausschließlich aus G und C besteht. Mit nur fünf Nucleotiden entspricht er der minimalen Anforderung an die Länge. Es wurde im Folgenden untersucht, ob sich dieser Primer zum Aufbau der Bindesequenzen für die Primer „CCUUC“, „CUCCCC“ und „CCCCC“ eignete. Zuerst wurde an einem „6C“ Templat die komplementäre Sequenz aus „6G“ aufgebaut. In Bild 55 sieht man, dass das bei Inkubation mit 2-MeImpG zu 71.5% gelang. Aber die Zugabe des zweiten Imidazolids 2-MeImpC inhibierte die Reaktion um 13.5%. Gab man die vier



Imidazolide 2-MeImpG, 2-MeImpC, 2-MeImpA und 2-MeImpU zu, bildete sich das P6 Produkt nur noch zu 33.5%.

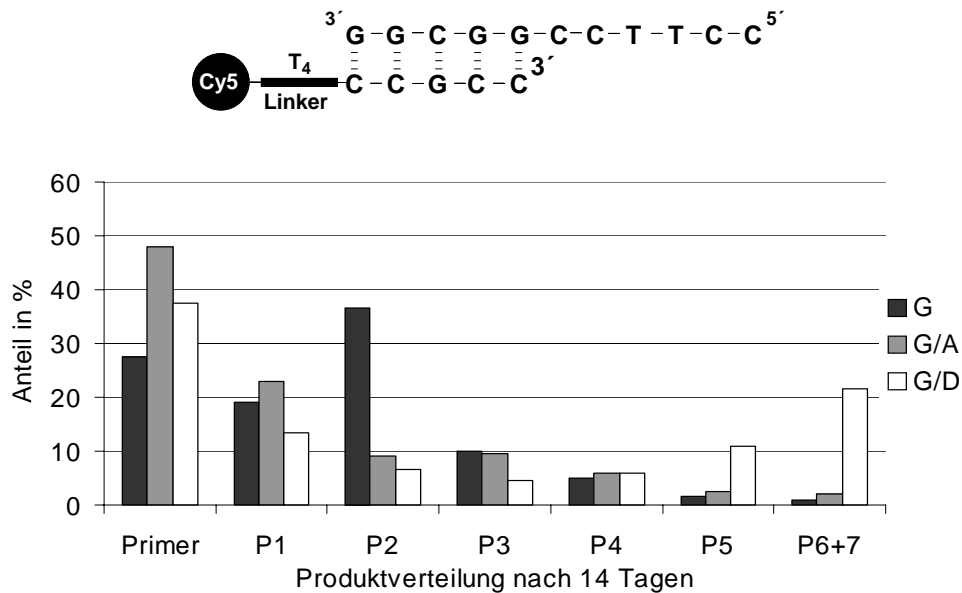


Bild 56: Einbau von G und D an Primer 13 mit Templat 13

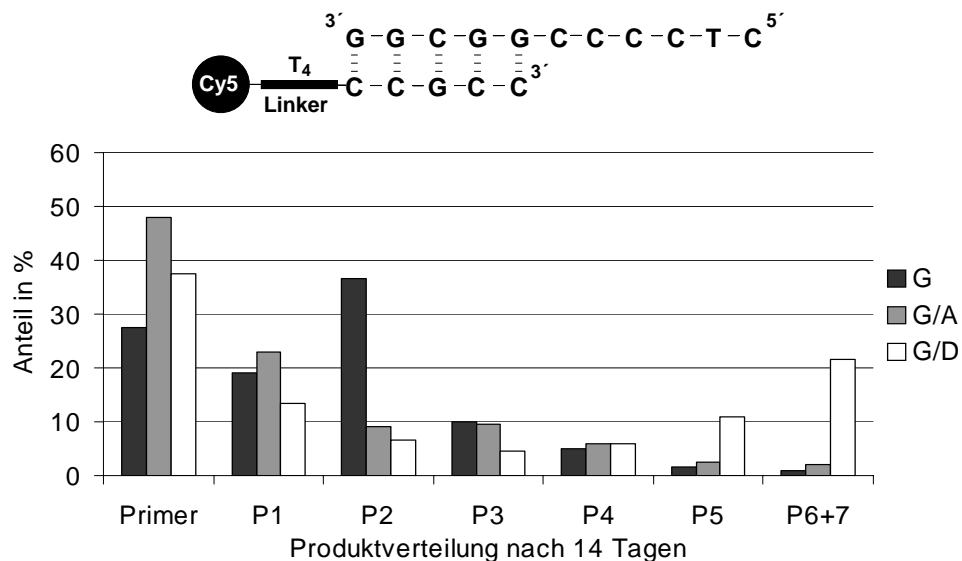


Bild 57: Einbau von G und D an Primer 13 mit Templat 14

Im zweiten Experiment inkubierte man mit dem Templat „CCTTCC“, wodurch die Bindesequenz für den Primer „CCUCC“ aufgebaut werden sollte (Bild 56). Mit den Imidazoliden 2-MeImpG und 2-MeImpD gelang das nur zu einem unbefriedigenden Anteil von 21.5%. Mit 2-MeImpG allein oder mit 2-MeImpG und 2-MeImpA erhielt man nur einen minimalen Anteil des P6 Produkts mit 1%

bzw. 2%. Die Kombination aus den Primern „CCGCC“ und „CCUUCC“ ist also nicht in der Lage als orthogonales Primerpaar zu dienen, mit dem eine Hin- und eine Rückreaktion realisiert werden könnte.

Zuletzt wurde ein Paar aus den Primern „CCGCC“ und „CUCCCC“ untersucht (Bild 57). In diesem Fall betrug die Ausbeute an vollverlängertem Produkt fast 50%, wenn der Einbau durch G- und D-Imidazolide erfolgte. Die Kreuzinhibierung spielt bei diesem Primer nicht die entscheidende Rolle. Dennoch ist er durch die zu niedrigen Ausbeuten an vollverlängerten Produkten für eine Art PCR-Experiment nicht geeignet.

#### 4.2.5.4 „CCCCCC“ Primer 12

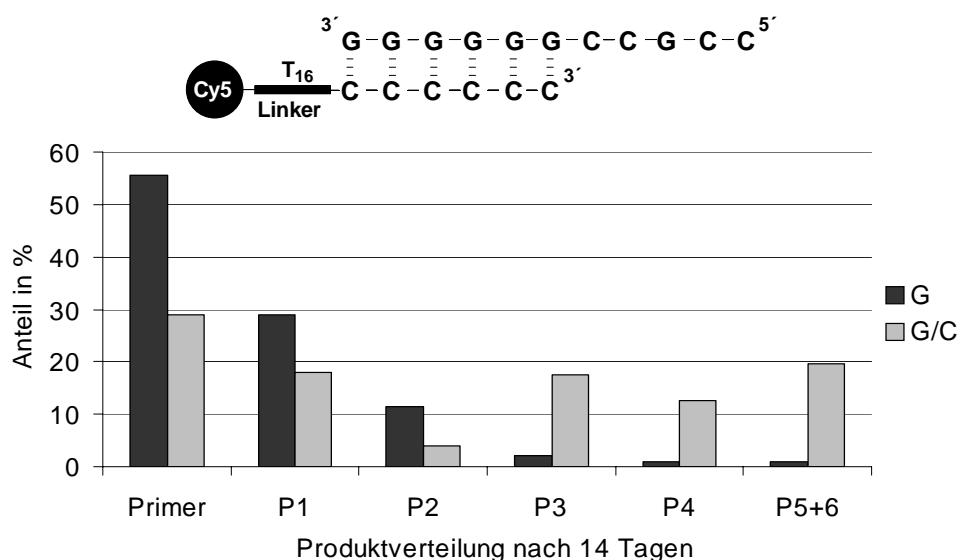


Bild 58: Einbau von G und C an Primer 12 mit Templat 15

Ein weiterer Primer, der den geforderten Bedingungen aus Kapitel 4.2.5 nahe kommt, ist der „CCCCCC“ Primer. Er besteht nur aus Pyrimidinen und zum Aufbau seiner Bindesequenz müssten ausschließlich G-Nucleotide eingebaut werden.

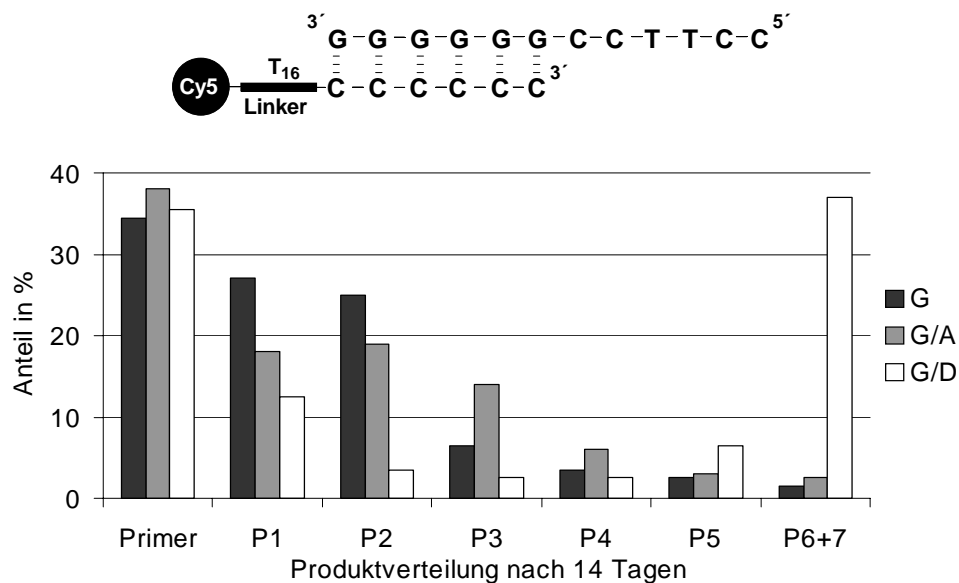


Bild 59: Einbau von G und D an Primer 12 und Templat 9

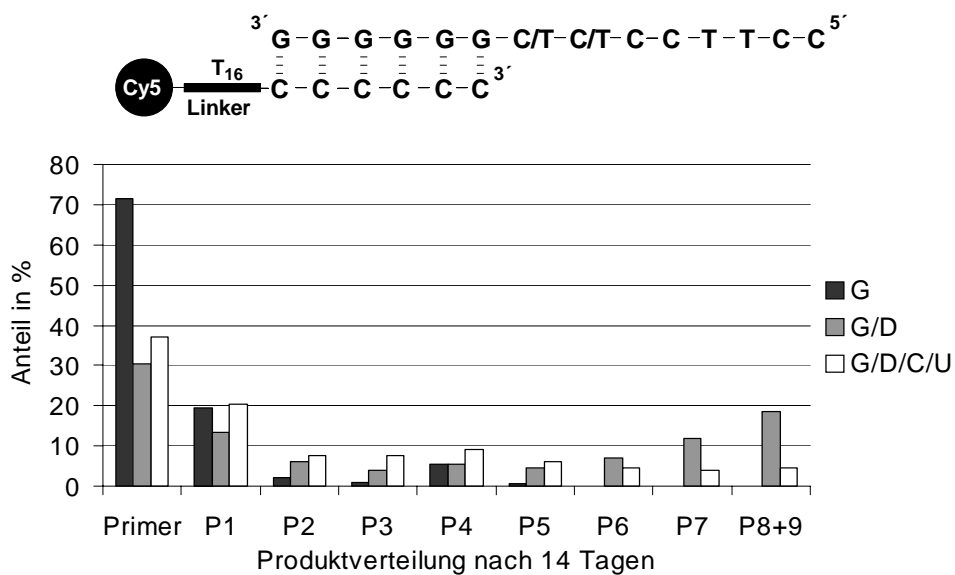


Bild 60: Einbau von G und G/D an Zufallspositionen an Primer 12 und Templat 69

Auch hier wurde durch die Kombinationen mit verschiedenen Templaten getestet, ob sich die Bindesequenz von einem evtl. orthogonalen Primer aufbauen ließ.

Zuerst wurde der Einbau an einem Templat untersucht, bei dem die Bindesequenz für den „CCGCC“ Primer aufgebaut werden sollte. Obwohl in diesem Fall nur G und C eingebaut werden mussten, war die Bildung des

vollverlängerten Produktes mit nur 20% sehr niedrig (Bild 58). Dieser Wert überrascht aber nicht, wenn man die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1.3 als Vergleich heranzieht. Die Abweichung von der idealen Doppelhelixstruktur, die sich bildet, wenn einzelne Pyrimidine zwischen Purinen angeordnet sind, verhinderte einen effizienten Einbau der Imidazolide.

Anschließend wurde der Primer mit dem „CCUCC“ Primer kombiniert. Dazu mussten an einem Templat gleichzeitig G und D Imidazolide eingebaut werden. Da es sich dabei aber jeweils um Purine handelte, die zum einen drei Wasserstoffbrücken zu ihrem Partner bilden konnten und zum anderen zu keiner Störung der Doppelhelixstruktur führten, waren hier höhere Ausbeuten am vollverlängerten Produkt zu erwarten (Bild 59).

Wie man sehen kann, gelang die Bildung des P6 Produktes mit nahezu 40%. Der Fehleinbau von G, wenn nur mit diesem Imidazolid allein inkubiert wurde, trat hier nur zu einem Anteil von 1.5% auf. Unwesentlich höher mit 2.5% war der Einbau, wenn zusätzlich das A-Imidazolid zugegeben wurden.

Da diese Ergebnisse recht viel versprechend waren, wurde die aufzubauende Sequenz um eine oder zwei Zufallspositionen erweitert. Zu Anfang wurde an zwei Stellen die Zufallsposition aus C und T eingeführt (Bild 60). Hier wurde nur bei der Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD eine befriedigende Ausbeute von 18.5% erzielt. Mit 2-MeImpG allein kam es zu keiner Produktbildung, was auch an den zwei aufeinander folgenden T im Templat lag (vgl. auch Zufallseinbau in Kapitel 4.2.5.1).

In einem weiteren Experiment wurde der Einbau gegenüber der Position aus A, C, G und T untersucht (Bild 61). Auch hier ergaben sich die besten Resultate bei der Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD. Es bildete sich zu 14.5% das vollverlängerte Produkt. Der niedrige Wert, der sich bei der Inkubation mit 2-MeImpG, 2-MeImpD, 2-MeImpC und 2-MeImpU ergeben hat, kann auf die Kreuzinhibierung der Imidazolide zurückgeführt werden.

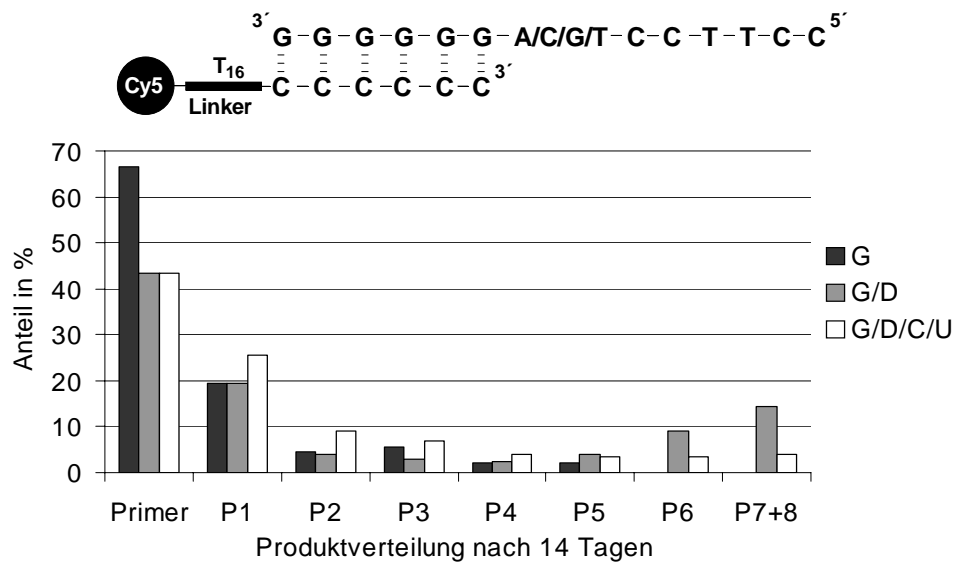


Bild 61: Einbau an Primer 12 und Templat 73

#### 4.2.5.5 „CCCCCG“ Primer 17

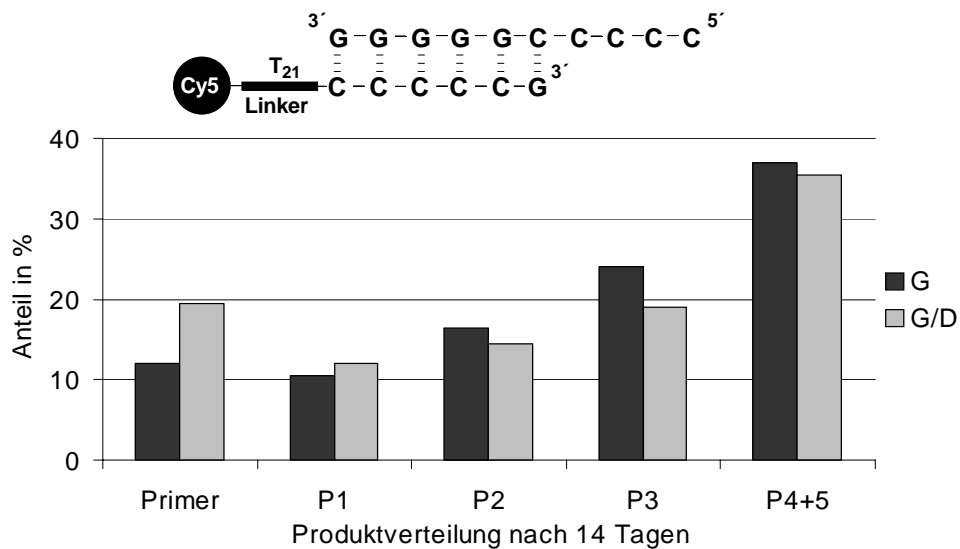


Bild 62: Einbau von G an Primer 17 und Templat 24

Abschließend wurden die Eigenschaften des Primers „CCCCCG“ untersucht. Das G am 3'-Ende sollte den Primer aus dem vorhergehenden Kapitel verbessern, da ein terminales G die Primerverlängerung unterstützt. Dieser Primer bestand außerdem nur aus G und C, seine Bindesequenz müsste sich also erfolgreich aufbauen lassen. Im ersten Experiment mit diesem Primer wurde der Einbau von 2-MeImpG untersucht (Bild 62).

Man sieht, dass der Einbau mit nur 37% vollverlängertem Produkt nicht sehr gut verlief. Der Grund dafür lag zum Einen an der selbstkomplementären Sequenz des Templats und zum Anderen in geringerem Maße an der Abfolge von Purinen und Pyrimidinen. Bemerkenswert war hier, dass der Zusatz von 2-MeImpD die Reaktion kaum inhibierte. Hier bildete sich das vollverlängerte Produkt noch zu 35.5%.

Bessere Ergebnisse erhielt man mit dem Templat „CCTTCC“ (Bild 63). Die Bildung des vollständig verlängerten Produkts lief mit einem Anteil von 54.5% ab, wenn die beiden Imidazole 2-MeImpG und 2-MeImpD zugegeben wurden<sup>18</sup>. Allein mit 2-MeImpG konnte nur die Bildung des P4 Produkts festgestellt werden<sup>19</sup>.

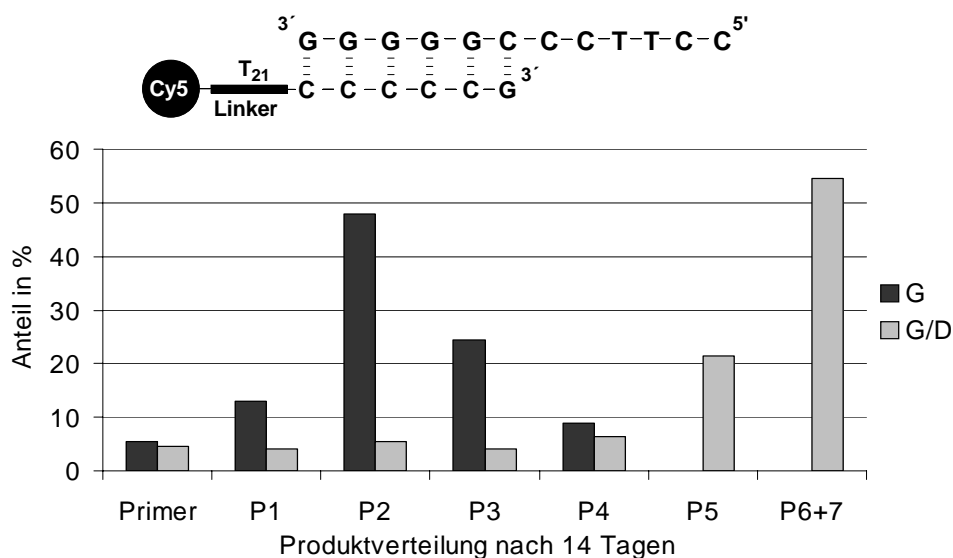


Bild 63: Einbau G und D an Primer 17 und Templat 21

In zwei weiteren Experimenten wurde untersucht, ob sich dieser Primer auch zur Verlängerung an Zufallspositionen eignete. In dem Experiment aus Bild 64 verlief die Polymerisation mit G- und D-Imidazoliden mit 29.5% bis zur Bildung des P6 Produkts. Die Inkubation nur mit 2-MeImpG allein lieferte das P6 Produkt zu 2.5%. Die Zufallssequenz aus Bild 65 bestand aus den vier Basen A,C,G und T an einer Position. Der Einbau verlief hier erneut am besten, wenn

<sup>18</sup> Beim „CCCCC“ Primer bildete es sich zu 37%

<sup>19</sup> Bei dem „CCCCC“ Primer bildete sich das vollverlängerte Produkt zu 1.5%

mit den beiden Imidazoliden G und D inkubiert wurde (23.5%). Die zweitbesten Ergebnisse erhielt man bei Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpC (21%). Fügte man aber die vier Imidazole 2-MeImpG, 2-MeImpD, 2-MeImpC und 2-MeImpU zu, ging der Wert auf 11.5% zurück. Mit G allein bildete sich P6 mit 6.5%.

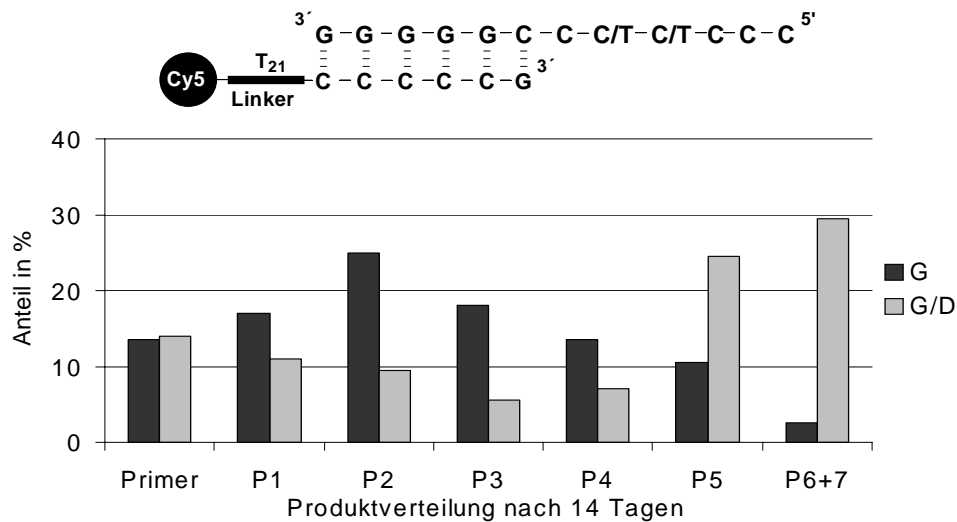


Bild 64: Zufallssequenzen in Templat 85, Einbau an Primer 17

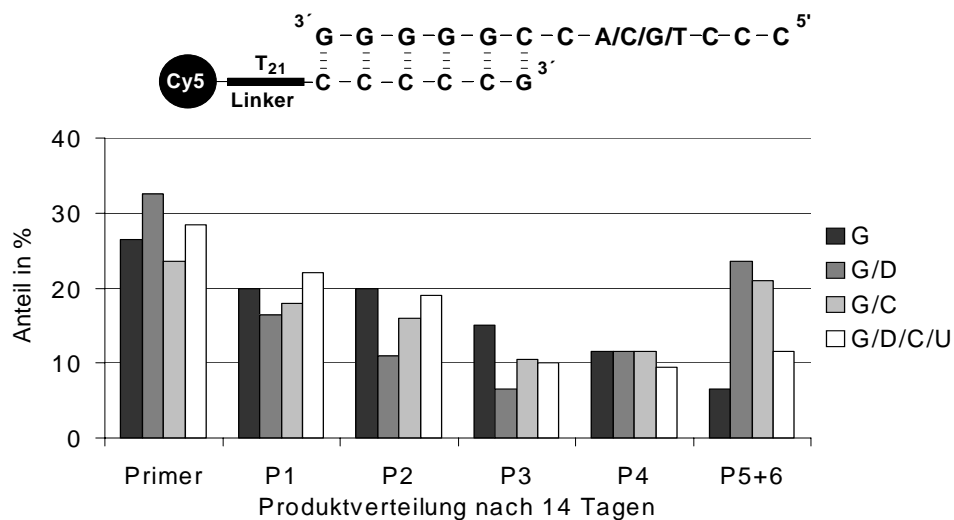


Bild 65: Inkubation an der Zufallsposition aus A/C/G/T mit Primer 17 und Templat 86

Zusammenfassend kann man sagen, dass der „CCCCCG“ Primer dem „CCCCC“ Primer hinsichtlich den Ausbeuten und der Selektivität überlegen war. Auch neigte er zu einer niedrigeren Kreuzinhibierung. Er hat aber den Nachteil, dass es durch das zusätzliche G geringfügig schwieriger ist, seine Bindesequenz aufzubauen.

Die Untersuchungen zu den unterschiedlichen Primern zeigte also, dass die aufzubauende Bindesequenz einen ganz erheblichen Einfluss auf das Verlängerungsverhalten der Primer hatte.

Ungeschlagen in Effizienz und Reaktionsgeschwindigkeit war weiterhin der „GCACG“ Primer. Sein Vorteil lag zum einen am terminalen G und zum anderen in seiner relativen hohen Duplexstabilität durch 4 G/C Basenpaare. Das Phänomen der Kreuzinhibierung trat hier am Geringsten in Erscheinung. Spielten aber auch die Anforderung eine Rolle, dass sich die Primerbindesequenz durch einen orthogonalen Primer aufbauen lassen musste, konnte man nicht auf diesen Primer zurück greifen. Es kamen dann einfacher konstruierte Primer zum Einsatz, die aber nicht die Vorteile des „GCACG“ Primers besaßen. Es galt einen Kompromiss dieser aufgezählten Kriterien zu finden.

#### **4.2.5.6 „CCUUCC“ Primer<sup>21</sup> mit verkürztem Spacer**

Unter Beachtung der beschriebenen Kriterien wurde das Primerpaar aus „CCCCC“ und „CCUUCC“ als orthogonale Partner für eine nichtenzymatische PCR gewählt. Da die beiden vorhandenen Primer aus Kapitel 4.2.5.1 und 4.2.5.4 sich in ihrer Länge nicht ausreichend unterschieden, um ihre Verlängerung mit dem DNA-Sequencer gleichzeitig zu beobachten, wurde die Länge des „CCUUCC“ Primer um sechs Nucleotide verkürzt. Jetzt unterschied er sich von dem „CCCCC“ Primer um 13 Nucleotide, was ausreichend für eine simultane Detektion war.

Mit diesem neuen Primer wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um zu zeigen, dass sich seine Eigenschaften nicht von denen des längeren Primers 15 unterschieden. Zuerst wurde der Einbau von G untersucht. In Bild 66 sind



die Werte des langen und des kurzen Primers gegenübergestellt. Man sieht, dass sie gut übereinstimmen.

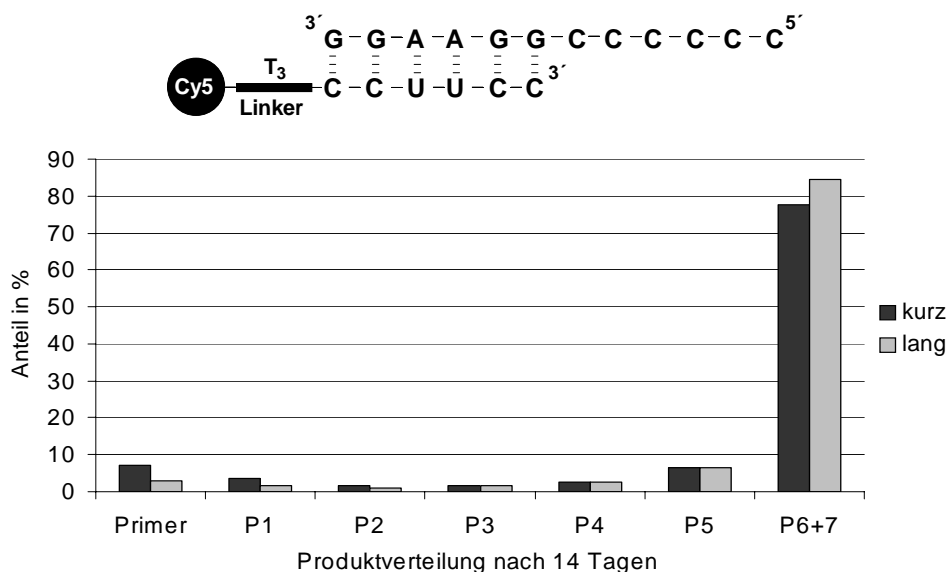


Bild 66: Einbau von G an Primer 21 mit Templat 18

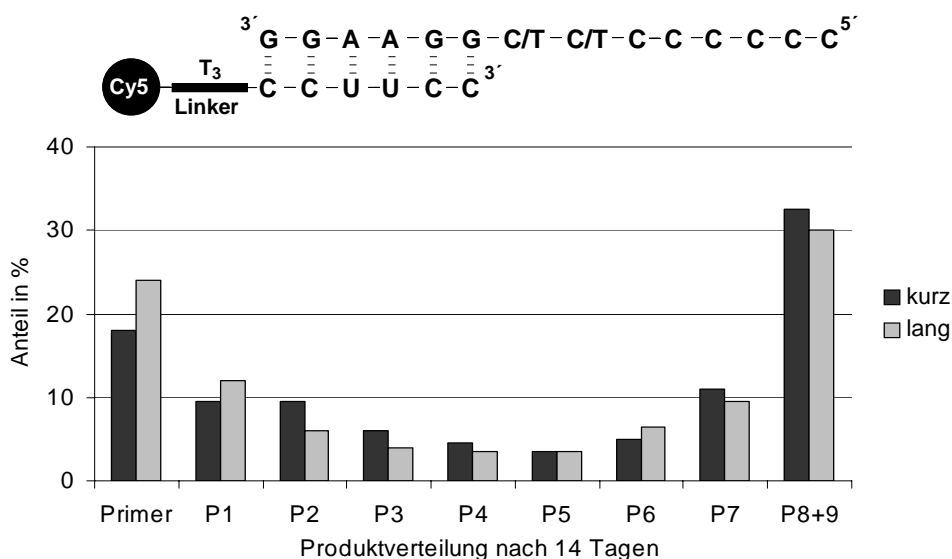


Bild 67: Inkubation mit 2-MelmpG und 2-MelmpD mit Primer 21 und Templat 67

Auch weitere Experimente belegten, dass sich beide Primer ähnlich effizient verlängern ließen (Daten siehe Kapitel 7.4.8). Als Beispiele ist in Bild 67 der Einbau gegenüber zwei Zufallspositionen aus [C/T] dargestellt. Auch hier wurde der Primer bei Inkubation mit G- und D-Imidazoliden zu annähernd gleichen Anteilen verlängert. Als nächstes galt es nun, beide Primer in einem Reaktionsgefäß gleichzeitig reagieren zu lassen.

### 4.2.6 Zwei verschiedene Primer

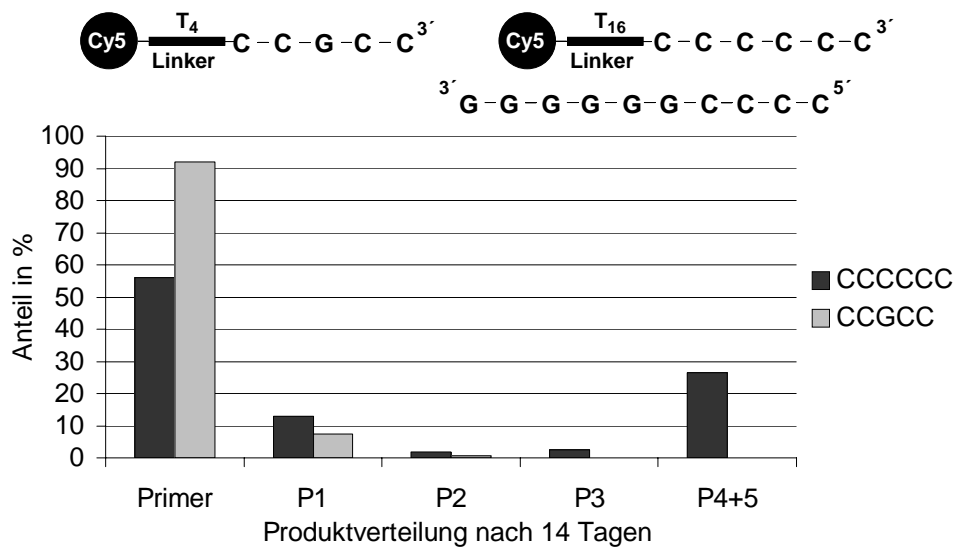


Bild 68: Verlängerung von Primer 12 bei Anwesenheit von Primer 13 und Templat 11

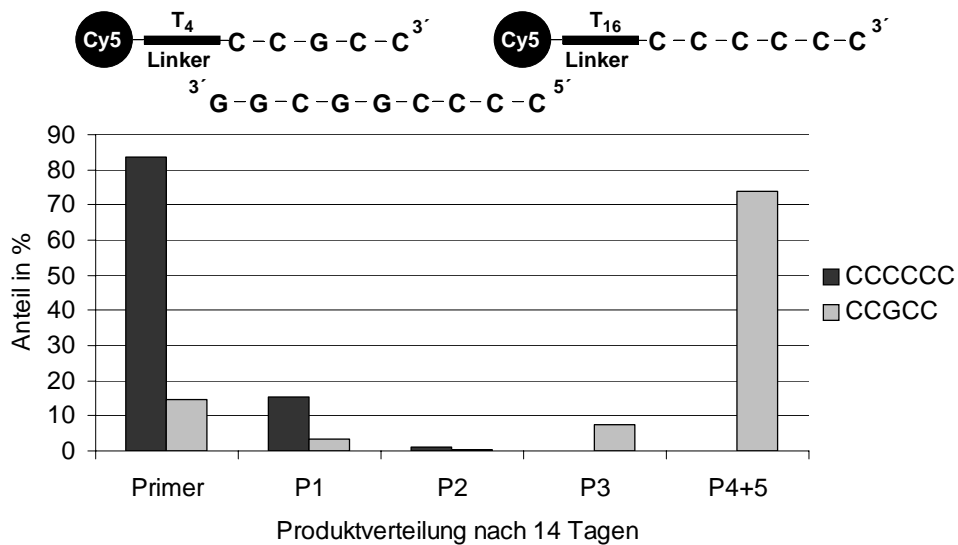


Bild 69: Verlängerung von Primer 13 bei Anwesenheit vom Primer 12 und Templat 12

In diesem Kapitel werden Experimente beschrieben, die zeigen sollten, ob die gewählten Primerpaare orthogonal zueinander waren. Dazu wurden in einem Reaktionsgefäß zwei Primer und ein Templat vereinigt. Im Idealfall wird nur der Primer verlängert, der mit dem Templat einen Duplex eingehen kann. Gibt man beide zu den Primern passende Template zu, werden auch beide Primer

verlängert. Hartel hat diese Experimente schon erfolgreich mit den Primern „CUCCCC“ und „CCUUCC“ durchgeführt (Kapitel 2.2).

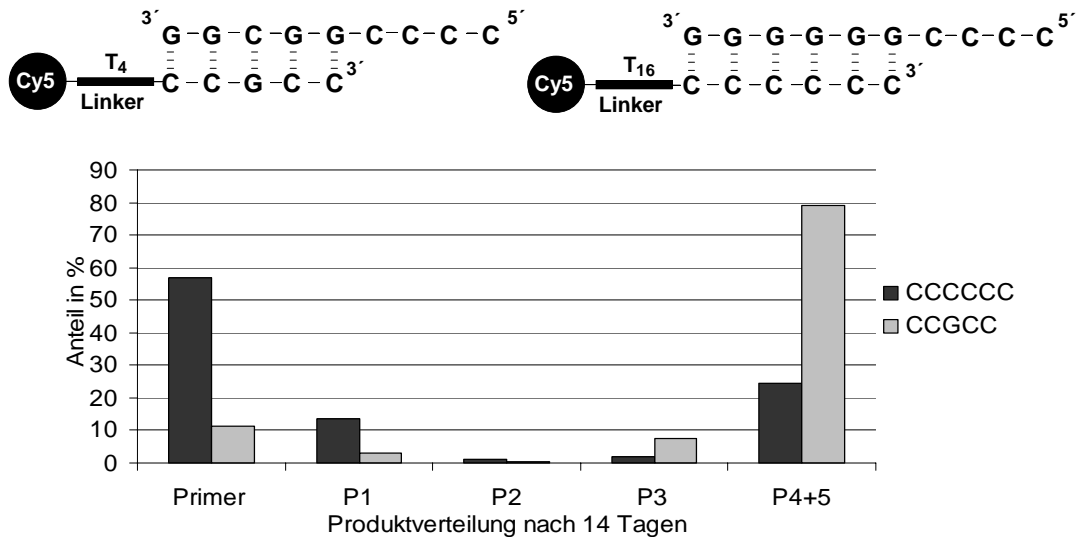


Bild 70: Verlängerung von beiden Primern 12 und 13 bei Anwesenheit von beiden Templaten 11 und 12

Es wurden die beiden Primerpaare „CCGCC“ / „CCCCCC“ und „CCUUCC“ / „CCCCCC“ auf ihre Orthogonalität hin untersucht.

Im ersten Fall wurde jeweils eine Sequenz von „4G“ aufgebaut. Es zeigte sich, dass beide Primer sich jeweils nur mit dem zu ihm passenden Templat verlängern ließen (Bild 68 und Bild 69). Durch den großen Unterschied in ihrer Länge ließen sie sich gut durch die Gelelektrophorese auftrennen. Fügte man zu beiden Primern beide passenden Template, gingen beide Primer eine Kettenverlängerung ein (Bild 70).

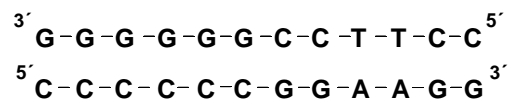


Bild 71: Die Template 9 und 18 haben eine komplementäre Sequenz

Bei einem zweiten Primerpaar, das auf seine Orthogonalität untersucht wurde, handelte es sich um Primer der Sequenzen „CCCCCC“ und „CCUUCC“. Das ist das Primerpaar, auf das schon in Kapitel 4.2.5.6 eingegangen worden ist. Anders als wie im zuvor beschriebenen Fall wurde hier nicht eine Sequenz von

„4G“, sondern die Primerbindesequenz des jeweilig anderen Primers aufgebaut. Das führte allerdings dazu, dass das Experiment mit beiden Primern und beiden Template in einem Reaktionsgefäß nicht durchgeführt werden konnte. Die Template hatten nämlich zwingend eine komplementäre Sequenz (Bild 71). Sie bildeten also stabilere Duplexe untereinander als mit den Primern. Der Primer „CCCCC“ wurde mit dem zu ihm passenden Template zu 42.5 % bis zum P6 Produkt verlängert, der Primer „CCUUC“ mit dem passenden Template zu 62 % (Bild 73). In beiden Fällen wurden sowohl D-Imidazole als auch G-Imidazole eingesetzt. Die Primer ohne zugehöriges Template gingen hier keine Kettenverlängerung ein.

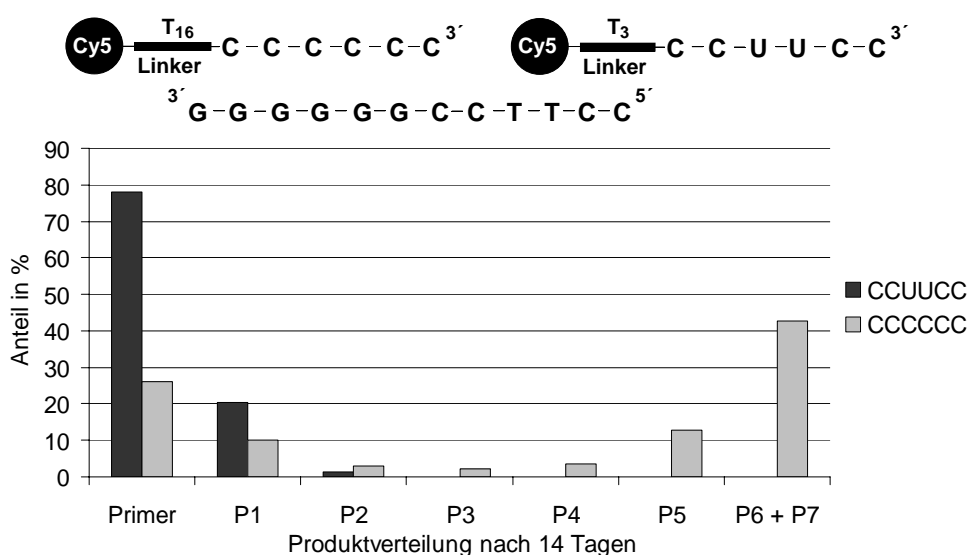


Bild 72: Verlängerung von Primer 12 bei Anwesenheit von Primer 15 und Template 9

Trotz der in Bild 71 beschriebenen Problematik wurde versucht, beide Primer in Anwesenheit der beiden passenden Template zu verlängern. Der „CCCCC“ Primer bildete immerhin zu 15% das vollverlängerte Produkt. Bei dem „CCUUC“ Primer ließ sich nur das P2 Produkt detektieren<sup>20</sup>.

Man kann also eindeutig sagen, dass es sich bei den Primern „CCCCC“ und „CCUUC“ um ein orthogonales Primerpaar handelte. Die Primer ließen sich effizient verlängern, auch wenn der zweite Primer im selben Reaktionsgefäß anwesend war. Durch die Zugabe eines bestimmten Templates ließ sich steuern,

<sup>20</sup> Daten sind nicht gezeigt.

welcher der beiden Primer verlängert werden sollte. Damit waren wichtige Kriterien für eine PCR-artige Reaktion gegeben.

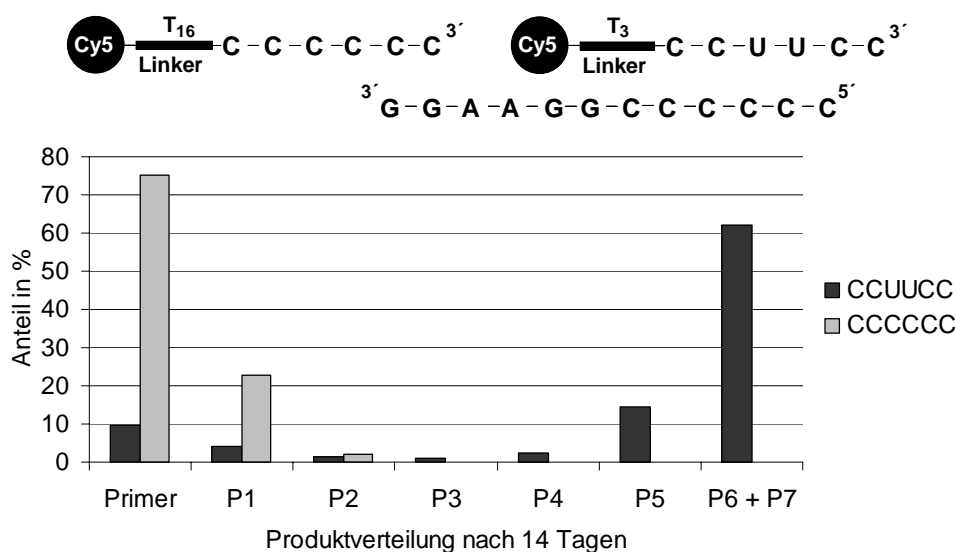


Bild 73: Verlängerung von Primer 15 bei Anwesenheit von Primer 12 und Templat 18

#### 4.2.7 Isolierung der Verlängerungsprodukte

Der einfachste Weg zur Durchführung einer Rück-Reaktion wäre es, den zweiten Primer und frische Imidazolide der Reaktionslösung aus der Hin-Reaktion zuzugeben. Der Duplex aus vollverlängertem Primer A und Templat A wäre aber in jedem Fall stabiler als der Duplex aus dem Primer B für die Rückreaktion und vollverlängertem Primer A aus der Hin-Reaktion. Deshalb muss erst ein Schritt vorgeschaltet sein, der diesen Duplex trennt. Bei der enzymatischen PCR geschieht dies durch kurzzeitigen Erhitzen. Außerdem wird dort ein großer Überschuss an Primern zugefügt. Diese Vorgehensweise wurde hier nicht angewendet. In den Experimenten lag immer ein Überschuss der Template vor. Dadurch war es nötig, das vollverlängerte Produkt mittels PAGE von Templaten, Monomeren und Salzen zu trennen.

Bei diesem Aufreinigungsschritt ließ sich der Verlust an Material nicht verhindern. Um trotzdem genug Verlängerungsprodukt für die Rückreaktion isolieren zu können, wurde der Reaktionsansatz eines herkömmlichen Oligomerisierungsexperiments (siehe Kapitel 7.4) verdreifacht. Durch die Fällung der Nucleinsäuren durch Zugabe von EtOH erfolgte eine erste Reinigung. Mit den so gewonnenen Pellets wurde anschließend die Gelelektrophorese durchgeführt. Die Banden wurden ausgeschnitten und in einen Puffer eluiert. Eine Entsalzung durch erneute EtOH-Fällung und Zentrifugation lieferte das aufgereinigte Produkt. In Bild 74 ist das Ergebnis einer solchen Aufreinigung gezeigt. Das aufgereinigte Produkt enthält zum größten Anteil das P6 Produkt und zu einem geringen Anteil das P7 Produkt (untere Abbildung).

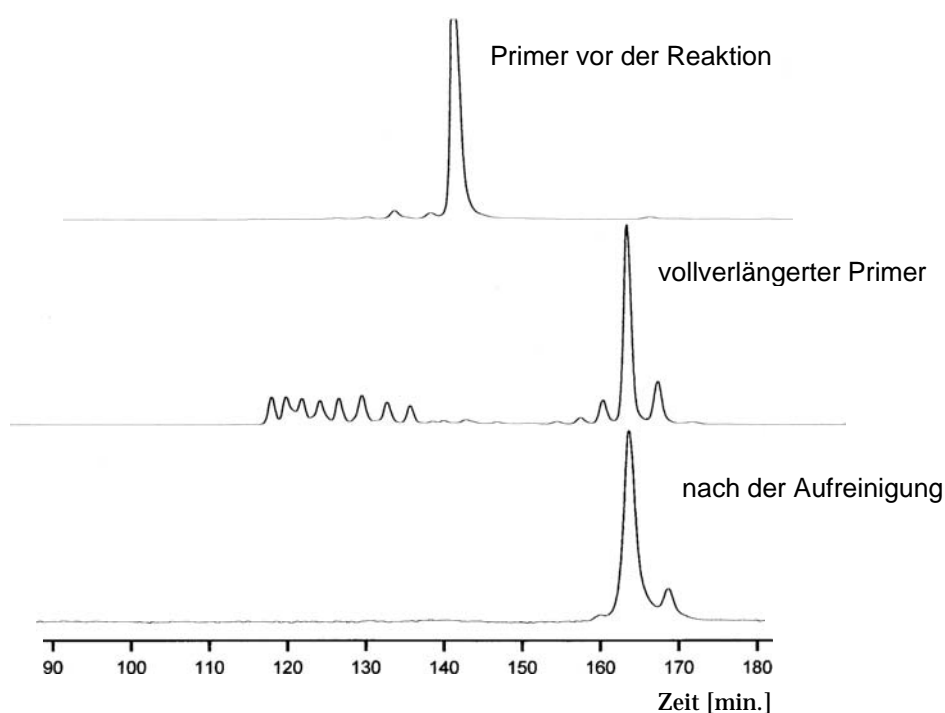


Bild 74: Primer 15 vor der Reaktion (oben), das vollverlängerte Rohprodukt (Mitte) und der aufgereinigte vollverlängerte Primer (unten)

### 4.2.8 Die Rückreaktion

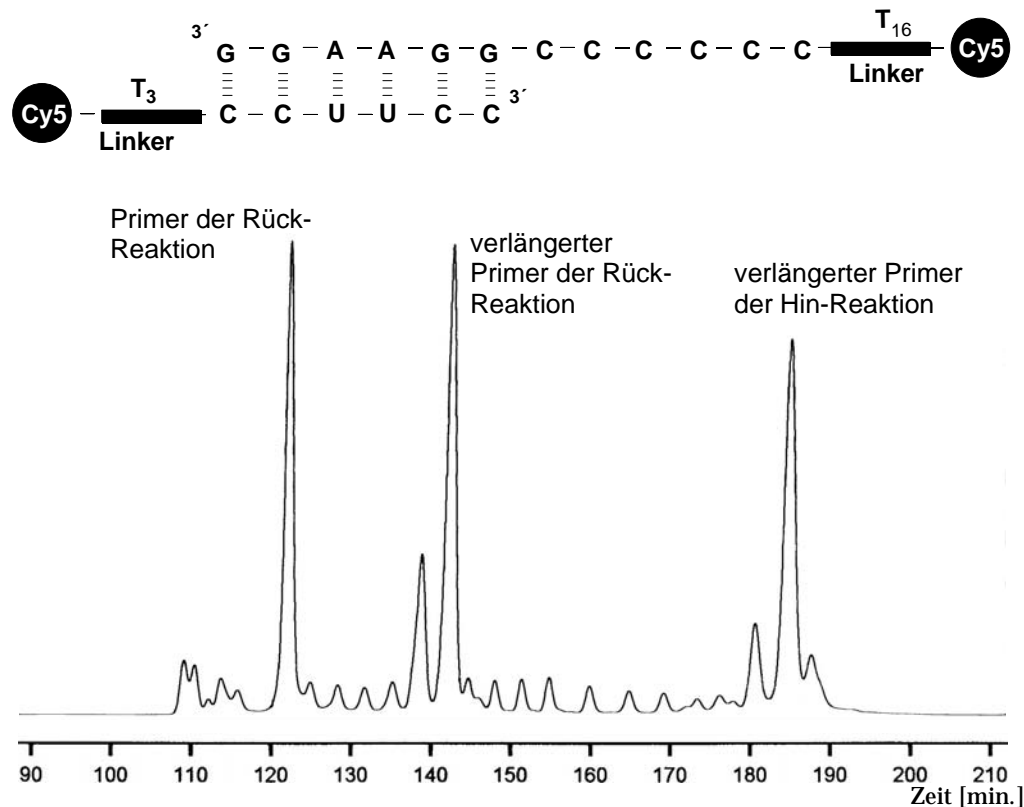


Bild 75: Rückreaktion mit Primer 21 am verlängerten und aufgereinigten Primer 12 als Templat nach 7 Tagen

Zur Durchführung der Rück-Reaktion wurde das aufgereinigte Pellet in 8.1 µl Wasser aufgenommen. Dazu gab man in der Reihenfolge Puffer, Primer und Imidazolide in den Mengen eines herkömmlichen Oligomerisierungsexperiments. Nach 1,2,3,7 und 14 Tagen entnahm man eine Probe. Man konnte feststellen, dass die Reaktion aus Bild 75 aus Primer 21 und vollverlängertem Primer 12 nach 14 Tagen das vollverlängerte Produkt zu 42 % lieferte. Bei dem Experiment aus Bild 76 mit Primer 12 und vollverlängertem Primer 21 ließ sich ein Wert von 33 % für das vollverlängerte Produkt nach 14 Tagen ermitteln. Man kann deutlich sehen, dass es möglich ist, ein nichtenzymatisches PCR-artiges Experiment auf der Grundlage von RNA Primern mit einem vorgeschalteten Aufreinigungsschritt durchzuführen.

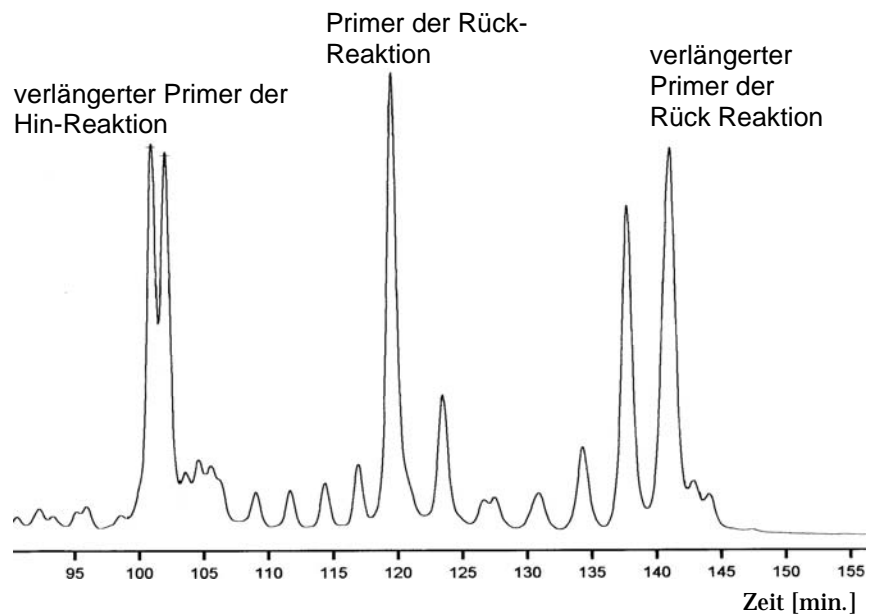
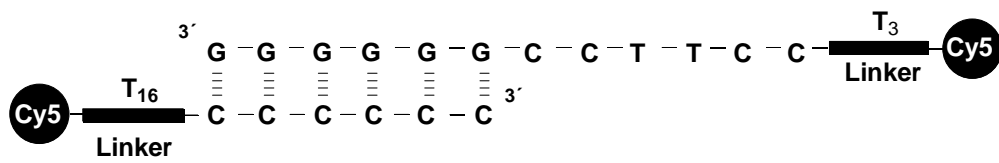


Bild 76: Rückreaktion mit Primer 12 am verlängerten und aufgereinigten Primer 21 als Templat nach 7 Tagen



### 4.2.9 Hydrolyse und HPLC Analytik

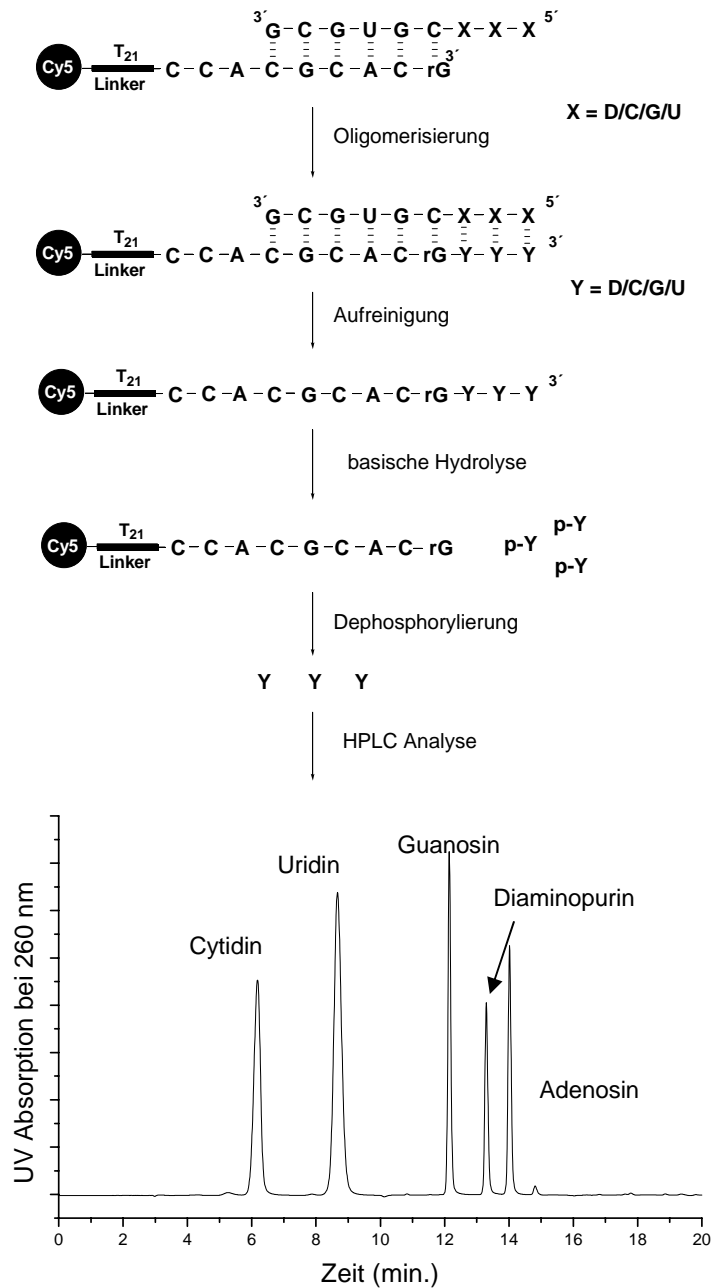


Bild 77: Schema für die HPLC Analyse eines Verlängerungsprodukts (Primer DNA, Templat und Monomere RNA)

Nun galt es noch die Frage zu klären, ob sich das nichtenzymatische PCR Experiment des vorherigen Kapitels zu einem Selektionsexperiment erweitern lässt. Dazu müssten zwischen die Bindesequenzen im Templat an einer oder

mehreren Stellen Zufallspositionen eingefügt werden. Eine HPLC-Analytik, die sich an eine Hin- und Rückreaktion anschließt, kann die Frage klären, welches Nucleotid zu welchem Anteil eingebaut wurde. Dazu muss das Reaktionsprodukt isoliert, einer basischen Hydrolyse unterworfen und mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert werden. Eine HPLC-Analytik zur Trennung aller fünf Nucleoside erwies sich als gut durchführbar (Kapitel 4.2.9). In Bild 77 ist Schema für die Analyse eines Selektionsexperiments gezeigt. Der Primer bestand aus DNA mit einem terminalen rG, das Templat aus RNA. Der Grund für diesen abweichende Versuchsaufbau war, dass die Bindesequenz des Primers bei einer alkalischen Hydrolyse nicht abgebaut werden sollte, da nur die eingebauten Nucleotide analysiert werden sollten. Um trotzdem zu garantieren, dass der Duplex in der A-Konformation vorlag, war es nötig, dass das Templat aus RNA aufgebaut waren. An die Primerbindesequenz schloss sich eine Sequenz aus drei Zufallspositionen mit den Basen D, C, G und U an. Das P3 Produkt kann anschließend mit einer Gelelektrophorese isoliert werden (siehe Kapitel 4.2.7). Eine folgende alkalische Hydrolyse der eingebauten Ribonucleotide lieferte die 5'-Monophosphate der eingebauten Nucleotide. Durch eine Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase erhielt man die Nucleoside D, G, C und U. Deren Anteil wurde mit einem geeigneten Gradienten durch die RP-HPLC bestimmt. In Bild 77 ist ein Chromatogramm der Analyse der möglichen Produkte einer solchen Hydrolyse gezeigt <sup>21</sup>. Im folgenden Kapitel werden weitere Voruntersuchungen beschrieben, die das Ziel haben, ein Selektionsexperiment aufzubauen.

---

<sup>21</sup> Bedingungen für HPLC: linearer Gradient mit 0 min. 100 % A, 5 min. 100 % A, 30 min. 70 % A in B, A: NH<sub>4</sub>OAc 10 mM, pH 4.5, B MeCN, Fluss 0.8 ml/min., Säule Bischoff Prontosil 120-5 mm OD SAQ 5.0 µm

#### 4.2.9.1 Analyse des Einbaus von G und D

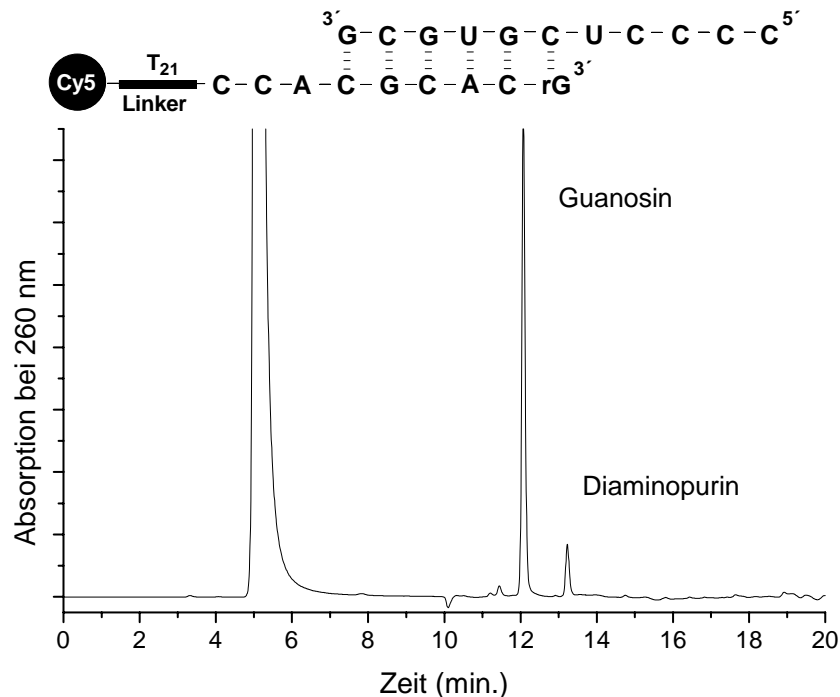


Bild 78: HPLC-Analyse der Hydrolyseprodukte nach Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD, Verhältnis von G zu D von 5.6:1 (Primer aus DNA, Templat aus RNA)

Mit Hilfe der eben beschriebenen Analysentechnik sollte die Frage beantwortet werden, welches Imidazolid denn gegenüber einem oder zwei T in einer „homoC“ Sequenz eingebaut wird, wenn sowohl 2-MeImpG als auch 2-MeImpD zur Verfügung stehen. Denn wenn man in dem Experiment aus Bild 41 auf Seite 48 nur mit 2-MeImpG inkubierte, fand ja ein Fehleinbau von G zu 13 % statt.

In Bild 78 ist das Chromatogramm einer solchen Analyse gezeigt. Das Templat bestand aus RNA, der Primer aus DNA mit einem terminalen rG. Es sollten vier G und ein D eingebaut werden. Nach Integration und Normierung mit den Extinktionskoeffizienten der Basen, ergab sich ein experimenteller Anteil von 5.6:1 von G zu D. Daraus konnte man schließen, dass gegenüber T auch zu einem großen Teil 2-MeImpD eingebaut wurde, wenn es der Reaktion zugesetzt wurde. Durch eine Gleichung, die in Kapitel 7.4.12 aufgeführt ist, lässt sich der

Wert des korrekten Einbaus von D zu 76% berechnen. Das entspricht auch den Ergebnissen von Orgel, die in Kapitel 2.2 beschrieben wurden [69].

Das Experiment aus Bild 79 bestätigte diesen Befund. Hier berechnete sich der Anteil von G zu D mit 2:1. Durch die HPLC Analytik wurde ein Wert von 2.6:1 ermittelt. Bei einem angenommen einfach falschen Einbau beträgt der Wert nach der Rechnung aus Kapitel 7.4.12 für den korrekten Einbau von D 67%, bei dem doppelt falschen Einbau beträgt er 83%<sup>22</sup>.

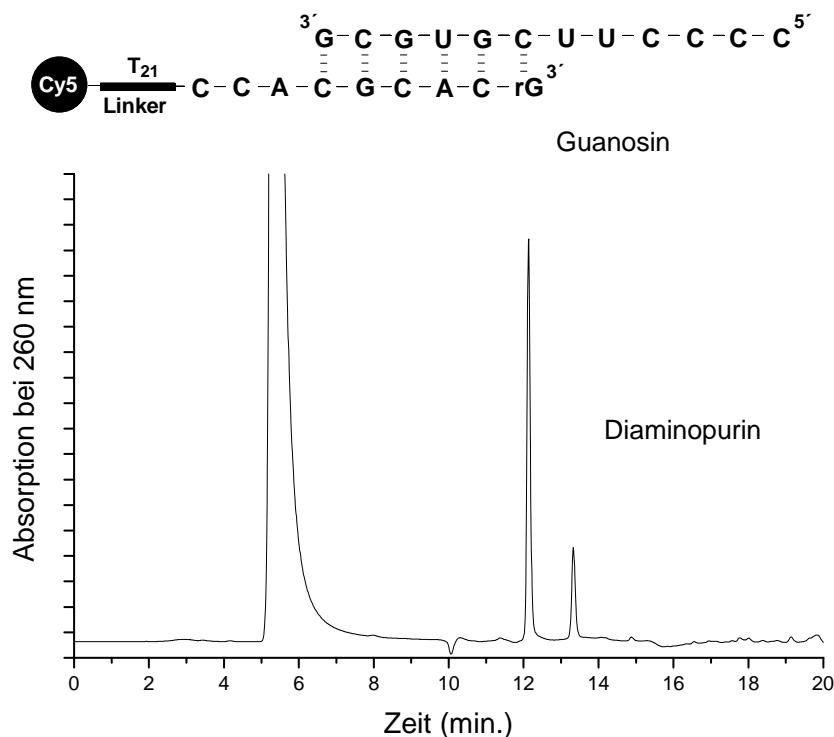


Bild 79: HPLC-Analyse der Hydrolyseprodukte nach Inkubation mit 2-MelmpG und 2-MelmpD, Verhältnis von G zu D von 2.6:1 (Primer aus DNA, Templat aus RNA)

Man kann zusammenfassend sagen, dass es möglich war, die Verlängerungsprodukte zu isolieren, zu hydrolysieren und zu analysieren. Man erhielt Chromatogramme, die gut integrierbar waren. So konnte man das Verhältnis der eingebauten Imidazole genau bestimmen.

<sup>22</sup> Der Fehler dieser Methode wurde durch eine genaue Einwaage der beiden Komponenten und einer anschließenden HPLC-Analyse bestimmt. Die Abweichung von eingewogenem und gemessenem Verhältnis betrug 9%. Der Fehler mehrerer Injektionen untereinander war kleiner als 1% (Daten sind nicht gezeigt).

#### 4.2.9.2 Analyse des Einbaus gegenüber drei Zufallspositionen

Das Templat dieses Experiments (Bild 80) wurde analog zu den anderen Templaten mit Zufallspositionen synthetisiert. Für den Einbau der undefinierten Positionen wurden die vier Phosphoramidite aus C, G, D und U zu gleichen molaren Anteilen in einem Gefäß gemischt. Um nachzuweisen, dass jedes der vier Phosphoramidite zu gleichen reagierte, wurde ein gemischtes Oligonucleotid aus DNA und RNA mit der Sequenz „3' TTT-XXX 5'“ (X = rC, rG, rD und U) hydrolysiert und mittels HPLC analysiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die vier Phosphoramidite zu etwa gleichem Anteil kuppelten.

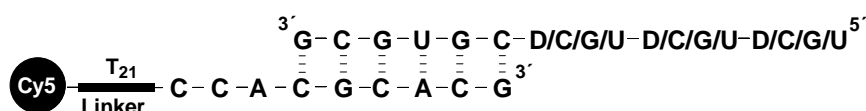


Bild 80: Experiment zur Analyse des Zufallseinbaus nach Inkubation mit 2-MeImpC, 2-MeImpG, 2-MeImpU und 2-MeImpD, Primer aus DNA, Templat aus RNA

Mit der Primer/Templat-Kombination aus Bild 80 wurden nach Inkubation mit 2-MeImpC, 2-MeImpG, 2-MeImpD und 2-MeImpU die Banden aller drei möglichen Verlängerungsprodukte ausgeschnitten, die Produkte eluiert und aufkonzentriert. Da sich die Verlängerungsprodukte nur zu einem geringen Anteil (siehe Kapitel 7.4.2.3) bildeten und sich bei der Gelelektrophorese keine scharfen Banden bildeten, wurde eine große Fläche des Gels ausgeschnitten. Dadurch ließ sich aber nur ein geringer Teil der Nucleinsäuren eluieren. Die Aufkonzentrierung, Dephosphorylierung und HPLC-Analyse lieferte trotz der Verfünffachung der Ausgangsmenge keine verwertbaren Signale.

Es müssen also Wege gefunden werden, mit denen man einerseits die Ausbeute der Verlängerungsprodukte steigern kann und man andererseits die Isolierung und Reinigung verlustfreier durchführen kann.

## 5 Weitere Experimente

Im Rahmen der Dissertation wurden weitere Arbeiten durchgeführt, die sich nur indirekt mit der nichtenzymatischen Oligomerisierung von Nucleinsäuren beschäftigten. Auf diese Untersuchungen wird in diesem Kapitel eingegangen. Es gliedert sich in zwei Abschnitte. Im ersten Teil werden Experimente beschrieben, die das Ziel haben, Methoden zur Markierung von Nucleinsäuren mit Fluoreszenzfarbstoffen zu entwickeln. Im zweiten Teil wird dargelegt, wie sich eine doppelhelicale RNA mit einer einzelnen 2',5'-Verknüpfung im Vergleich zu einer RNA nur aus 3',5'-Verknüpfung in Bezug auf deren Hydrolysen-Empfindlichkeit verhält.

### 5.1 Versuche zur Synthese fluoreszenzmarkierter Oligonucleotide

Wie schon in Kapitel 4 zu sehen war, besitzen Fluoreszenzfarbstoffe in der Analytik von Nucleinsäuren eine große Bedeutung. Hier werden Synthesewege zu zwei verschiedenen Derivaten des Fluoreszenzfarbstoffs Cy5 vorgestellt. Einmal wurde das kommerziell erhältliche Cy5-Phosphoramidit synthetisiert, mit dem bei der chemischen Festphasensynthese der Farbstoff direkt an das Oligonucleotid gekuppelt werden kann. Bei der zweiten Synthese wird ein Weg zu einem Cy5-Derivat mit einer reaktiven Gruppe beschrieben, die spezifisch mit Thiolen reagiert.

#### 5.1.1 Synthese des Fluoreszenzfarbstoffs

Das Cy5-Phosphoramidit wurde nach der Vorschrift von C. K. Brush und E. D. Anderson hergestellt [125]. In Bild 81 ist die Abfolge der Syntheseschritte wiedergegeben. Im ersten Schritt wird über eine Finkelsteinreaktion das Chlorpropylacetat **7** in das Iodpropylacetat **8** umgewandelt. Damit erfolgte die Alkylierung von 2,3,3-Trimethylindolenin **9** am Stickstoff, wobei das quartäre

Amin **10** entstand. Mit diesem Salz wurde mit Malonaldehydtetraethylacetat **11** eine Polymethinkondensation zu **12** durchgeführt<sup>23</sup>. Anschließend wurden die Schutzgruppen mit NaOMe zu **13** entfernt und eine OH-Gruppe mit DMT-Cl zu **14** geschützt<sup>24</sup>. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung wurde durch Phosphitylierung das Phosphoramidit **15** hergestellt.

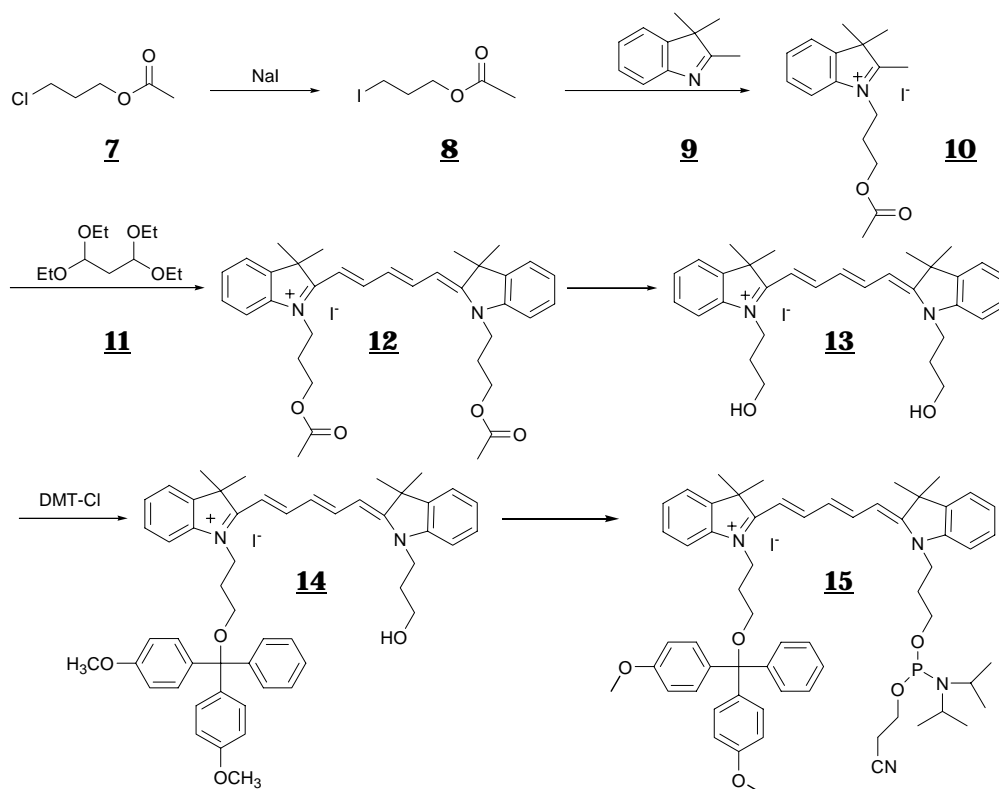


Bild 81: Synthese des Cy5 Phosphoramidits **15**

Die Herstellung des wasserlöslichen Cy5-Iodacetamids **30** wurde nach der Vorschrift von A. Touthkine, P. Nalbant und K. M. Hahn über eine konvergente Synthese durchgeführt [126]. Als erstes Zielmolekül wurde 5-Chloracetamidomethyl-1,3,3-trimethyl-2-methylenindolenin **20** hergestellt [127]. Dazu wurde im ersten Schritt die Fischer Base **16** mit N-Hydroxymethylphthalimid **17** in konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zur Verbindung **18** umgesetzt.

<sup>23</sup> in der Originalvorschrift wurde 1,3,3-Trimethoxypropen verwendet.

<sup>24</sup> hier wurde die Schutzgruppe ursprünglich mit HCl entfernt und mit MMT-Cl geschützt.

Nach der Abspaltung der Phthalsäure in siedender konz. aq. HCl wurde das freie Amin **19** mit Chloressigsäurechlorid zu **20** umgesetzt (Bild 82).

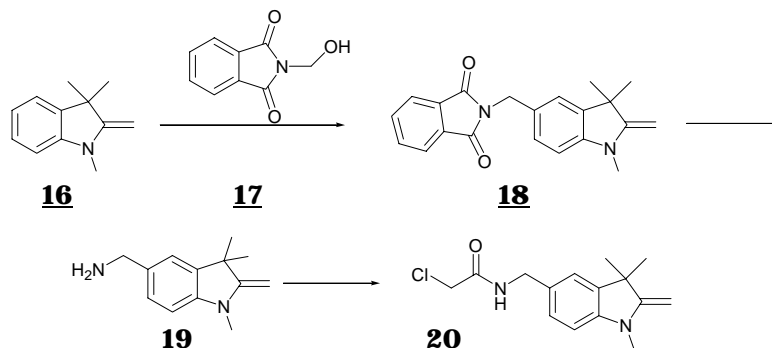


Bild 82: Synthese Indol-Chloracetamid **20**

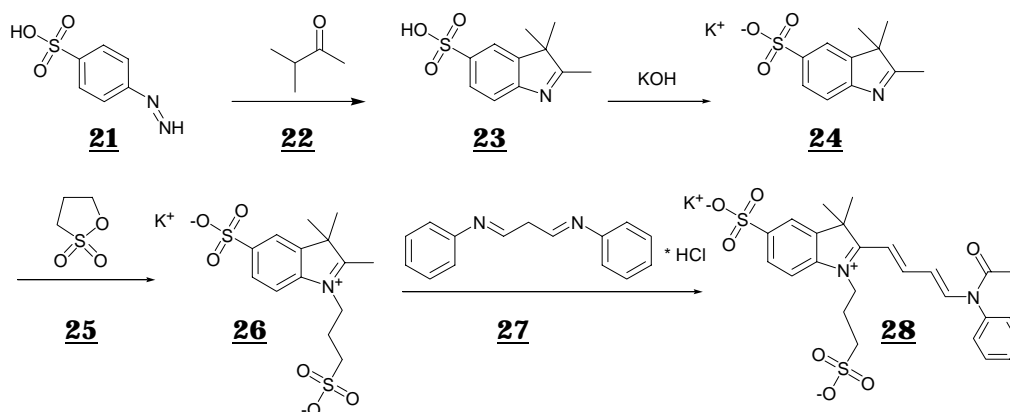


Bild 83: Synthese des Kopplungsbausteins **28**

Der zweite Baustein wurde nach einer Vorschrift zur Indolsynthese hergestellt [128]. p-Hydrazino-benzolsulfonsäure **21** reagierte mit 3-Methyl-2-butanon **22** zum 2,3,3-Trimethylindolinium-5-sulfonat **23**. Das wurde mit KOH in i-PrOH zum Kalium-Salz **24** umgewandelt und anschließend mit 1,3-Propansulton **25** am Stickstoff alkyliert. Dieses quartäre Amin **26** reagierte mit Malonaldehyd-Dianilid **27** Monohydrochlorid zu dem zweiten Zielmolekül **28** (Bild 83).



Diese beiden Zielmoleküle **20** und **28** wurden in der Wärme zum Chloracetamido-cyanin **29** kondensiert. Daraus lieferte eine nucleophile Substitution das gewünschte Iodacetamid **30** (Bild 84).

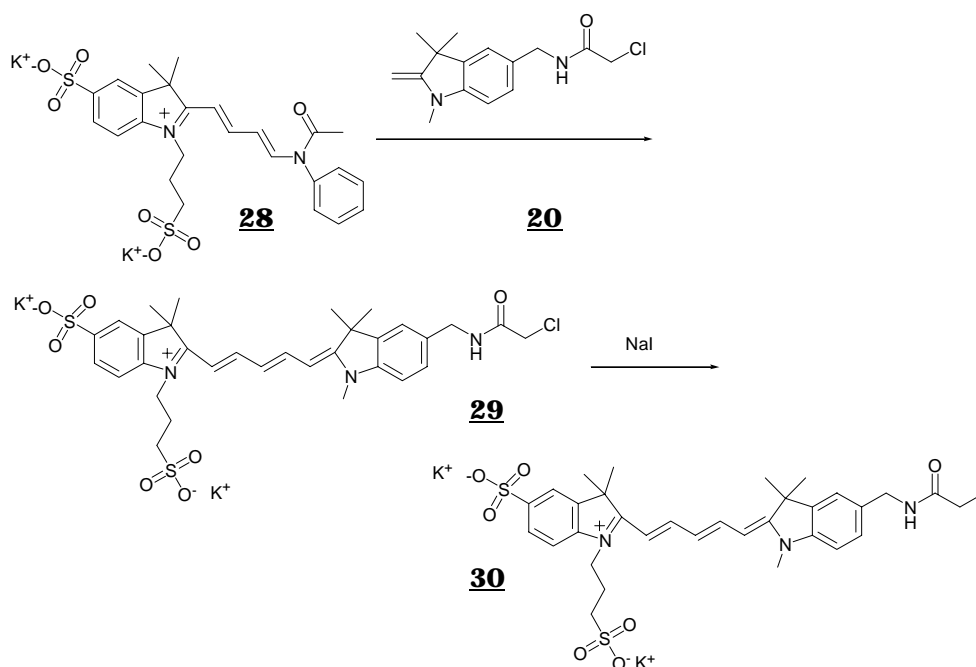


Bild 84: Synthese des Cy5 Iodacetamids **30**

### 5.1.2 Synthese schwefelhaltiger Guanosinmonophosphate

Die Markierung langer Ribonucleinsäuren ist im Gegensatz zu Desoxyribonucleinsäuren aufgrund der geringeren Kopplungsausbeuten über den Weg der chemischen Festphasensynthese nur sehr schwer möglich. Deshalb bedient man sich stattdessen einer Methode, bei der sich an eine Transkription ein chemischer Kupplungsschritt zur Markierung anschließt. Bei der Transkription wird zusätzlich zu den vier Nucleotid-Triphosphaten auch mit 5'-Deoxy-5'-thioguanosin-5'-monophosphorthioat GSMP **31** im Überschuss inkubiert. Die T7 Polymerase ist in der Lage, GSMP am 5'-Ende der Nucleinsäure einzubauen. Eine sich anschließende Hydrolyse liefert eine freie Thiolgruppe, die mit Maleinimiden oder Iodacetamiden reagieren kann [129].

Die Synthese eines schwefelhaltigen Monophosphats ist in Bild 85 gezeigt. Das isopropyliden-geschützte Guanosin **32** wurde mit MPTI **33** in der 5'-Position iodiert. Nach der Entfernung der Schutzgruppe mit Ameisensäure zu **34** erfolgte im letzten Schritt die Alkylierung des Natriumthiophosphats in Wasser zu GSMP **31**. Das Endprodukt konnte durch präparative HPLC gereinigt werden. Da es aber sehr hydrolyseempfindlich war, durfte eine Lösung beim Einkonzentrieren nicht erwärmt werden. Dadurch wurde die Aufarbeitung und Reinigung des GSMP **31** deutlich erschwert. Deshalb wurde versucht, eine Aufreinigung durch unterschiedliche Löslichkeit der Bariumsalze von **31** und des Thiophosphats zu erzielen. Das gelang auch soweit, dass mit **31** eine erfolgreiche Transkription durchgeführt werden konnte.

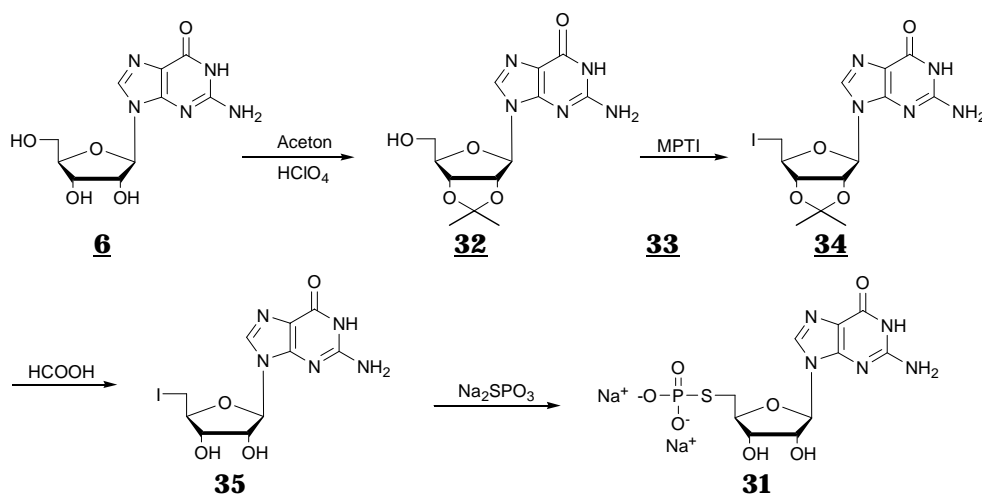


Bild 85: Synthese von GSMP **31**

Da die große Empfindlichkeit der Verbindung **31** aber auch durch bei der verbesserten Reinigungsmethode weiterhin Probleme bereitete, entschied man sich zu einem alternativen Weg. Dieser lieferte als Endprodukt das stabilere 5'-O-Thiomonophosphat GMPS **36** (Bild 86). Hier wurde zur Synthese das isopropyliden-geschützte Guanosin **32** mit PSCl<sub>3</sub> phosphoryliert. Eine folgende Hydrolyse und Abspaltung der Schutzgruppe mit verd. aq. HCl ergab GMPS **36** in guten Ausbeuten.

Mit GMPS **36** und dem Cy5-Iodacetamid **30** konnte erfolgreich eine Markierung langer Oligoribonucleotide durchgeführt werden.

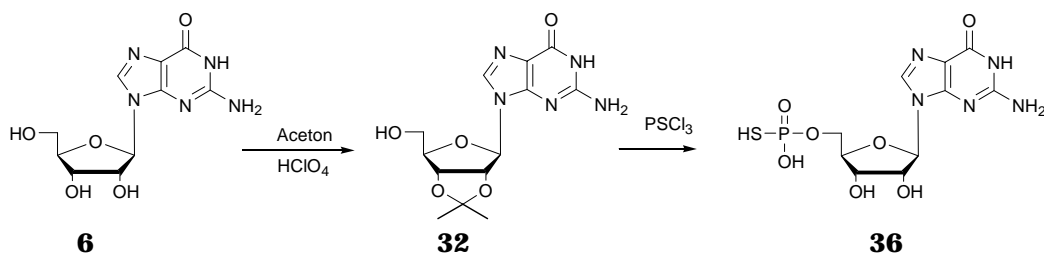


Bild 86: Synthese von GMPS 36

## 5.2 Hydrolyseexperimente zur Untersuchung der Stabilität der 2',5'-Bindung im Vergleich zur 3',5'-Bindung

In Experimenten aus dem Jahr 1976 zeigten D. A. Usher und A. H. McHale, dass eine unnatürliche 2',5'-Verknüpfung in Nucleinsäure-Duplexen zu höherer Hydrolyseempfindlichkeit führt [130]. Sie verglichen in ihren Arbeiten ein Oligomer aus A<sub>12</sub> mit einer isolierten 2',5'-Bindung und ein A<sub>12</sub>, das aus 3',5'-Bindungen besteht. In 1 M aq. Ethylendiamin (EDA) bei pH 8 und einer Temperatur von 40°C inkubierten sie mit und ohne OligoU als Gegenstrang. In der Abwesenheit von PolyU wurden beide 12mere unabhängig von ihrer Verknüpfung mit gleicher Geschwindigkeit hydrolysiert. Durch die Zugabe von OligoU versiebenfachte sich aber die Geschwindigkeit des Abbaus bei dem 12mer mit einer 2',5'-Bindung. Bei dem 12mer nur aus 3',5'-Bindungen verlangsamte sich der Abbau.

Es wurde in dieser Dissertation versucht, die Experimente mit modernen Messmethoden zu reproduzieren. Dazu wurden zwei Oligomere aus A<sub>12</sub> synthetisiert, die über einen Linker aus 6 dC mit dem Farbstoff Cy5 markiert waren. Inkubiert wurde mit PolyU und ohne PolyU als Gegenstrang bei 37°C und bei 10°C in 1M aq. EDA bei pH 8. Die Ergebnisse sind in Bild 87 und Bild 88 zusammengefasst. Die Darstellungen sind so gewählt, dass sich der Anteil des 12mers und des 6mers zu 100 % addieren.

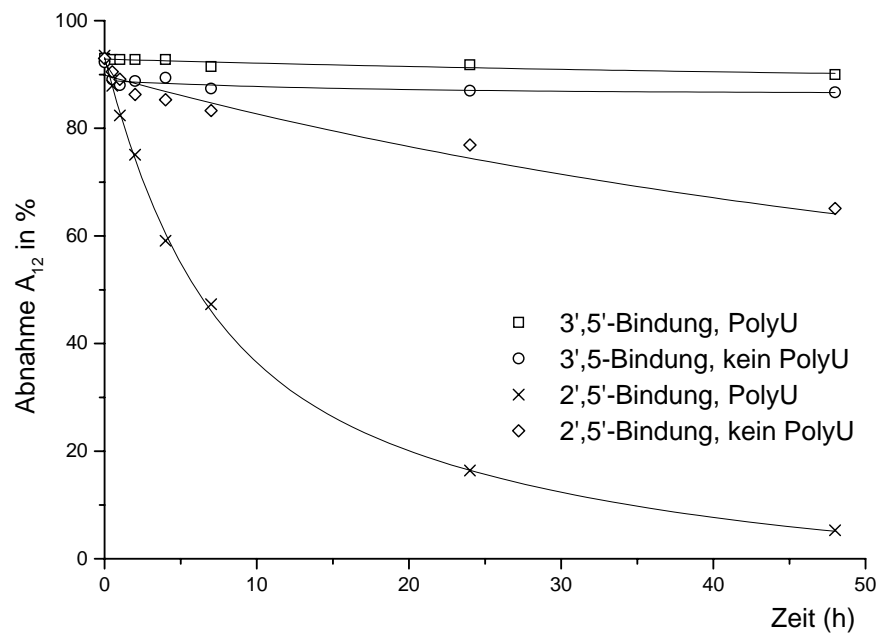


Bild 87: Hydrolyse von  $A_{12}$  bei 37°C in EDA im Vergleich zu entstehenden 6mer

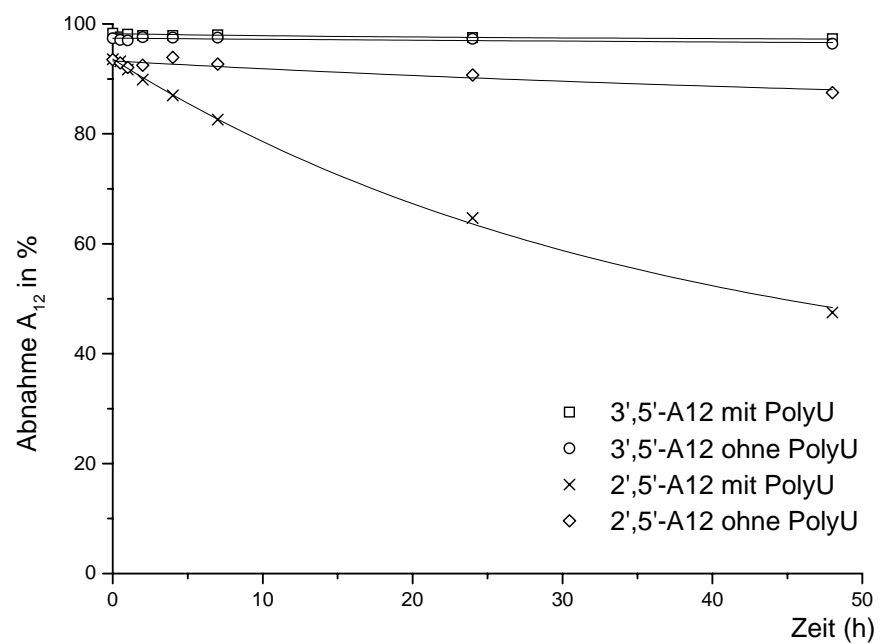


Bild 88: Hydrolyse von  $A_{12}$  bei 10°C in EDA im Vergleich zu entstandenem 6mer

Die Werte, die man für Inkubation bei 37°C erhielt, sind vergleichbar mit der Ergebnissen, von denen Usher und McHale berichtet haben<sup>25</sup>. In dem Experiment aus dem A<sub>12</sub> mit 2',5'-Bindung und PolyU war nach 6 h die Hälfte hydrolysiert. Die 12mere, die nur aus 3',5'-Bindungen bestanden, wurden unabhängig davon, ob ein Duplex oder ein Einzelstrang vorlag, kaum hydrolysiert.

Reduzierte man die Temperatur auf 10°C, erniedrigte sich die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich. Die Halbwertszeit für den Abbau von A<sub>12</sub> mit 2',5'-Bindung betrug hier 45 h. Die Tendenz in den Ergebnissen blieb aber erhalten (Bild 88). Hier war nur im Fall der Kombination aus A<sub>12</sub> mit 2',5'-Bindung und Poly U ein Abbau zu A<sub>6</sub> festzustellen.

In einer Erweiterung der Untersuchungen sollte sich zeigen, ob eine Differenzierung der unterschiedlichen Verknüpfungen auch in TRIS-Puffer zu beobachten ist. Dazu wurde zu den beiden A<sub>12</sub>-Oligomeren mit PolyU und/oder Mg<sup>2+</sup>-Ionen gegeben. Es ergaben sich somit acht Kombinationen, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Die deutlichste Hydrolyse von A<sub>12</sub> zu A<sub>6</sub> war in der Kombination aus 2',5'-Bindung, PolyU und MgCl<sub>2</sub> aufgetreten. Die Halbwertszeit betrug hier 75 h und war somit deutlich höher als wie im Fall von EDA als Puffer. Allgemein war hier zu sehen, dass nur bei die Zugabe von Mg<sup>2+</sup>-Ionen ein Abbau stattfand. Langsamer wurde das A<sub>12</sub> mit 2',5'-Bindung hydrolysiert wenn zwar MgCl<sub>2</sub> aber kein PolyU zugefügt wurde. In allen Experimenten mit A<sub>12</sub> mit 3',5'-Bindung war nur ein sehr geringer Anteil an gebildeten A<sub>6</sub> zu beobachten (Bild 89).

Tabelle 2: Kombinationen der Experimente in TRIS Puffer bei 37°C.

	PolyA	PolyU	MgCl <sub>2</sub>
MH 862	A12, 3',5'	ja	nein
MH 863	A12, 3',5'	nein	nein
MH 864	A12, 3',5'	ja	ja
MH 865	A12, 3',5'	nein	ja
MH 866	A12, 2',5'	ja	nein
MH 867	A12, 2',5'	nein	nein
MH 868	A12, 2',5'	ja	ja
MH 869	A12, 2',5'	nein	ja

<sup>25</sup> Dort wurde bei 40°C inkubiert

Auch die Experimente in TRIS-Puffer wurden bei einer Temperatur von 10°C durchgeführt. Hier war allerdings in dem beobachteten Zeitraum von sieben Tagen kein großer Unterschied in der Hydrolysegeschwindigkeit zu beobachten (Bild 90).

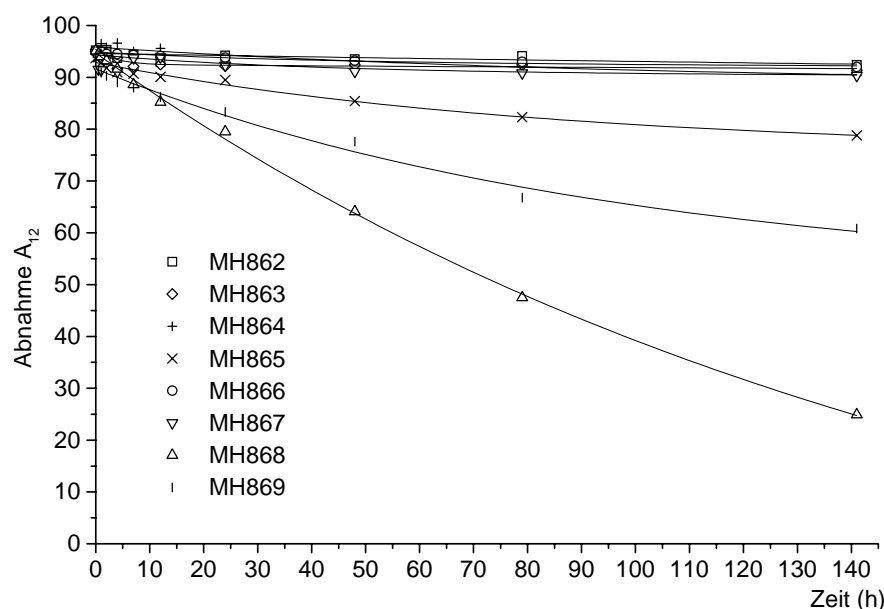


Bild 89: Abnahme  $A_{12}$  in TRIS Puffer bei 37°C, Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 2

Es wurden ergänzend weitere Nucleinsäuren mit anderen Sequenzen untersucht. Dazu wurden die markierten Oligomere Cy5-(dT)<sub>4</sub>-r(GCA.CG-(3',5')-A.CU)<sup>3'</sup> und Cy5-(dT)<sub>4</sub>-r(GCA.CG-(2',5')-A.CU)<sup>3'</sup> in den beiden Puffern (EDA und TRIS) mit einem Gegenstrang aus 3'd(GCG.TGC.TGA.GCC.CG)<sup>5'</sup> bei 37°C und 10°C inkubiert. Allerdings waren hier in keinem Fall Unterschiede in der Hydrolyse zu beobachten. Die Ursache für diesen Befund liegt einmal in der niedrigen Schmelztemperatur des Duplexes, sie liegt deutlich unter 37°C. Bei den Experimenten bei 10°C dagegen verlief die Hydrolysegeschwindigkeit zu langsam, um sich in dem beobachteten Zeitraum von sieben Tagen bemerkbar zu machen.

In den Experimenten nach Usher/McHale muss den Ergebnissen zufolge aber ein stabiler Duplex bei 40°C vorgelegen haben. Das kann daran liegen, dass PolyU mit kurzen OligoA Tripelhelices bildet [131]. Die Hydrolyse fand demnach in ihren Experimenten nicht in einem Duplex, sondern in einem Triplex statt.

Tabelle 3: Kombinationen der Experimente in TRIS Puffer bei 10°C

	PolyA	PolyU	MgCl <sub>2</sub>
MH 870	A12, 3',5'	ja	nein
MH 871	A12, 3',5'	nein	nein
MH 872	A12, 3',5'	ja	ja
MH 873	A12, 3',5'	nein	ja
MH 874	A12, 2',5'	ja	nein
MH 875	A12, 2',5'	nein	nein
MH 876	A12, 2',5'	ja	ja
MH 877	A12, 2',5'	nein	ja

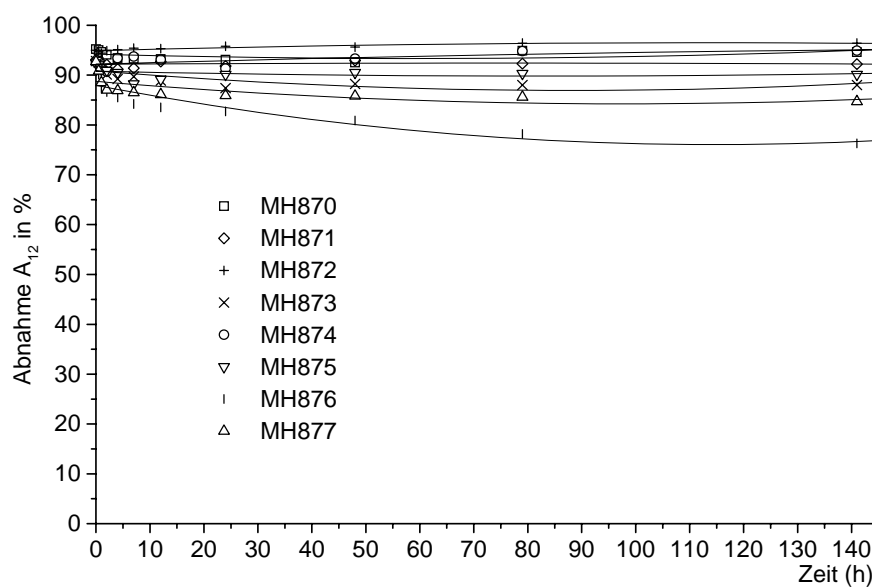


Bild 90: Abnahme  $A_{12}$  in TRIS Puffer bei 10°C, Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 3

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse beruhen auf der Durchführung und Analyse von Nichtenzymatischen Templatkontrollierten Oligomerisierungen von RNA. Dabei inkubierte man einen farbstoffmarkierten Primer aus RNA mit komplementären Templaten und aktivierten Monomeren, den 2-Methyl-Phosphorimidazoliden. Die Kettenverlängerung konnte anschließend durch Detektion des Fluoreszenzfarbstoffs nach einer Auftrennung der Produkte durch eine Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Durchführung eines nichtenzymatischen PCR-artigen Experiments möglich ist. Isolierte man das vollverlängerte Produkt des Primers der Hin-Reaktion und gab es zu einer Lösung mit dem orthogonalen Primer, konnte eine Rück-Reaktion beobachtet werden. Zur Trennung des Duplexes aus verlängertem Primer und Templat wurde eine Aufreinigung durch eine präparative Polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt.

Dieses Experiment aus Hin- und Rück-Reaktion diene nicht wie bei der herkömmlichen PCR zur Amplifizierung der Nucleinsäuren. Es bildete vielmehr die entscheidende Grundlage für ein Selektionsexperiment. Dazu mussten die Template um Zufallspositionen erweitert werden, die zwischen die Primerbindestellen eingefügt werden. Durch die Analyse der Produkte nach der Rück-Reaktion kann festgestellt werden, ob sich bestimmte Nucleotide in den Sequenzen angereichert haben.

Zur Durchführung wurde eine Methode basierend auf einer RP-HPLC entwickelt. Die vollverlängerten Produkte wurden mittels Gelelektrophorese isoliert und durch basische Hydrolyse in Monomere abgebaut. Nach einer anschließenden enzymatischen Dephosphorylierung konnte der Anteil der Nucleoside durch RP-HPLC bestimmt werden.

Die erste erfolgreiche Anwendung fand die Methode in der Analyse des Einbaus gegenüber T (U). Hier konkurrieren D (A) durch Watson/Crick-Paarung und G durch Wobble Paarung um die Bindestelle. Deshalb bildeten sich bei



gemischten Templaten aus C und T und der Inkubation nur mit G allein die vollverlängerten Produkte zu einem hohen Anteil. Bei Reaktionen mit den Imidazoliden G und D konnte durch die HPLC-Methode gezeigt werden, dass gegenüber T der Watson/Crick Partner D etwa dreimal häufiger eingebaut wurde als G.

Eine weitere wichtige Grundlage für ein Selektionsexperiment war die Untersuchung, ob sich gegenüber Zufallspositionen überhaupt eine Kettenverlängerung feststellen lässt. Dazu wurde die Verlängerung unterschiedlicher Primer mit verschiedenen Templaten untersucht, die an einer oder mehreren Stellen Positionen aus [C/T] oder [A/C/G/T] enthielten. Es war deutlich zu sehen, dass die Verlängerung an solchen random-Sequenzen möglich ist. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn man entweder nur mit 2-MeImpG allein oder mit 2-MeImpG und 2-MeImpD inkubierte. Die Verwendung aller vier Imidazole C, D, G und U führte zwar auch zu vollverlängerten Produkten, ihr Anteil war aber deutlich geringer.

Die Oligomerisierung an dem Templat 3'-GCG.UGC.-[D/C/G/U]-[D/C/G/U]-[D/C/G/U]-5' führte zu einem geringen Anteil zur Bildung der vollverlängerten Produkte. Eine Isolierung war dadurch nicht möglich. Weitere Experimente müssen zeigen, ob nach der Erhöhung der Ausbeuten und der Anwendung einer effizienteren Aufreinigungsmethode die Analyse des Einbaus an Zufallssequenzen möglich ist.

Eine andere wichtige Aufgabe dieser Dissertation war die Aufklärung der Ursache für die kritische Länge der Template. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von G-Quadrupelsträngen nicht der Grund ist, der den reibungslosen Einbau an längeren „homoC“ Templaten verhindert. Zusätze von NaCl oder LiCl beeinflussten die Effizienz dieser Reaktionen kaum.

Gute Resultate wurden bei der Verlängerung an Homopyrimidin-Templaten, die aus C und T bestanden, erzielt. Das vollverlängerte Produkt bildete sich bei der Verwendung von 2-MeImpG und 2-MeImpD in hohen Ausbeuten.

Interessante Resultate ergaben sich im Fall des Einbaus von C an „homoG“ Templaten. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn völlig auf Na<sup>+</sup>-Ionen verzichtet wurde. Die Verwendung von Li-Imidazoliden, die auch in höherer

Konzentration eingesetzt werden konnten, steigerte die Effizienz dieser Reaktionen deutlich. Durch das reduzierte *stacking* liefen alle Reaktionen allerdings langsamer und unvollständiger ab als beim Einbau von G an „homoC“ Templaten. Die Stabilisierung des Duplexes durch *stacking* ist also mindestens genauso wichtig wie die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen.

Überraschend schlechte Ergebnisse waren zu beobachten, wenn die Template gleichzeitig aus G und C aufgebaut waren. Die vollständig verlängerten Produkte wurden zu einem sehr geringen Anteil gebildet. Zusätzlich zum geringeren *stacking* der Pyrimidine, wurden Unregelmäßigkeiten in der Doppelhelixstruktur, die durch das abwechselnde Auftreten von Purinen und Pyrimidinen verursacht worden sind, als Ursache ausgemacht.

Eine erfolgreiche Primerverlängerung durch bei der templatkontrollierten Oligomerisierung ist also an viele Voraussetzungen gebunden. Wichtig ist, dass der Duplex in der A-Konformation vorliegt. Deshalb ist es nötig, dass wenigstens der Primer oder das Templat aus RNA aufgebaut ist. Von großem Vorteil ist, wenn der Duplex durch Basenpaare stabilisiert wird, die drei Wasserstoffbrücken ausbilden können. Weiter wurde immer deutlicher, dass Stapelwechselwirkungen mindestens ebenso wichtig für einen effizienten Einbau sind. Der Einbau von Purinen verlief in jedem Fall besser als der Einbau der Pyrimidine. Als neues Kriterium hat sich das Vorliegen einer regelmäßigen Doppelhelixstruktur herausgestellt. Schon durch die Abfolge von Purinen und Pyrimidinen wird diese so stark gestört, dass eine erfolgreiche Kettenverlängerung inhibiert wird.

Mit der Kombination aus den Basenpaaren C/G und D/U wurde ein viel versprechendes System gefunden, wie man am Beispiel des Einbaus an Pyrimidin-Templaten aus C und T sehen konnte. Eine Verbesserung dazu könnte durch die Ergänzung mit dem isoC/isoG Basenpaar erreicht werden. Dieses ist genauso stabil wie das C/G Basenpaar. Gleichzeitig ist es orthogonal zu diesem.

Es ist leicht möglich, isoG/isoC als zusätzliches Basenpaar einzusetzen. Das Phosphorimidazolid 2-MeImp(isoG) wurde erfolgreich synthetisiert. Damit kann z.B. der Einbau gegenüber isoC oder G untersucht werden. Führt man eine

Analyse der verlängerten Produkte durch, ist es möglich, alle sechs Nucleoside durch die HPLC nachzuweisen (Bild 91).

Eine weitere Möglichkeit, um die Effizienz der Oligomerisierung zu steigern, besteht darin, das System nur aus Purin-Basen aufzubauen. Es gibt einige Beispiele für Purin/Purin-Paarungen, die entweder aus zwei oder drei Wasserstoffbrücken bestehen (Bild 92). Die erhöhte Stapelwechselwirkung erhöht die Stabilität eines Duplexes, der aus diesen Basen aufgebaut ist.

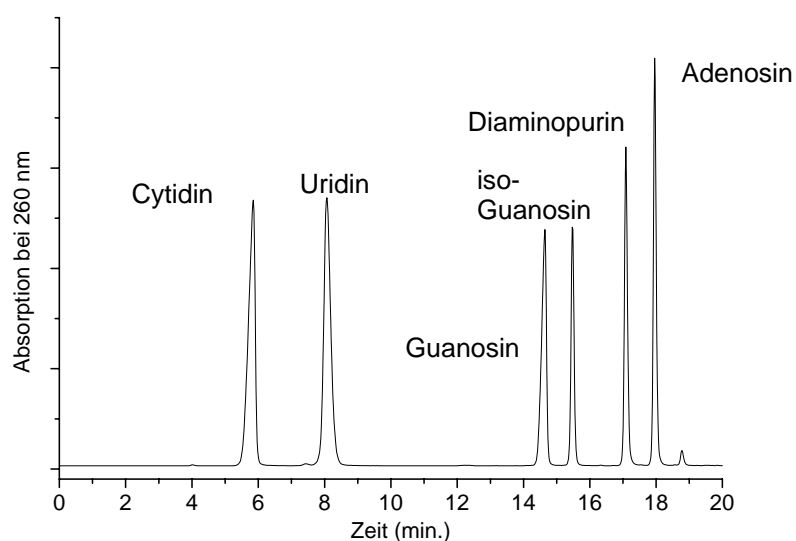


Bild 91: HPLC-Analyse der sechs Nucleoside Cytidin, Uridin, Guanosin, iso-Guanosin, Diaminopurin und Adenosin

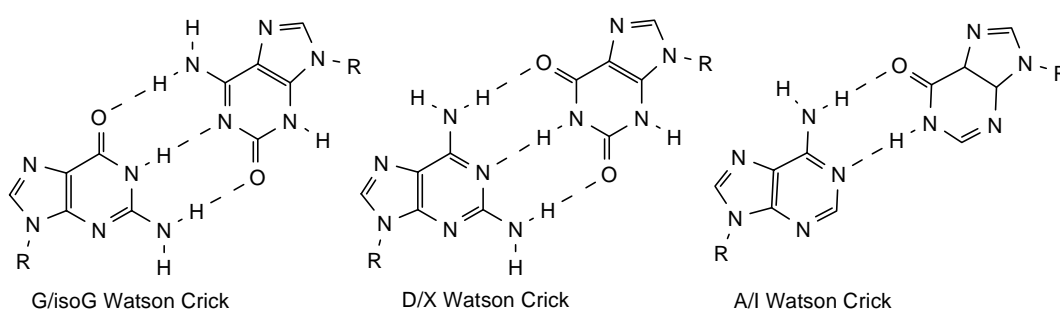


Bild 92: Beispiele für Purin/Purin-Basenpaare

Eine weitere deutliche Verbesserung kann die Oligomerisierung mit Dimeren anstelle von Monomeren liefern. Inkubiert man mit den Phosphorimidazoliden verschiedener Dinucleotide, müssten sie aufgrund der höheren Wechselwirkung schneller mit dem Primer zu längeren Oligonucleotiden kondensieren.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

**Schmelzpunkte:** Heiztischmikroskop nach *Kofler*, unkorrigiert

**<sup>1</sup>H-Kernresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR):** *Bruker AM 250, Bruker AMX 400*. Chemische Verschiebungen ( $\delta$ ) wurden in ppm und Kopplungen in Hertz (Hz) angegeben. Als interner Standard diente das d<sub>6</sub>-DMSO Signal ( $\delta$  = 2.50 ppm). Die Multiplizitäten wurden mit s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett oder m = Multiplett bezeichnet. Die Angaben entsprechen dem experimentellen Erscheinungsbild, nicht der theoretisch zu erwartenden Multiplizität.

**<sup>31</sup>P-Kernresonanzspektroskopie (<sup>31</sup>P-NMR):** *Bruker AMX 400* (162 MHz). Als externer Standard diente Phosphorsäure.

**Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR):** *Perkin-Elmer 1600*. Die Wellenzahlen (cm<sup>-1</sup>) wurden auf ganze Zahlen gerundet. Angabe der Intensitäten mit s = strong, m = medium und w = weak.

**Massenspektroskopie (MS):** ESI: *Fisons VG Platform II, MaLDI*

**Elementaranalyse:** *Hereaus CHN-Rapid*

**Ultraviolettspektroskopie (UV):** *Cary Bio-1E* mit *Cary* Temperiereinheit. Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte über *Cary WinUV* Software Version 1.0 unter *Microsoft Windows95*.

**Dünnschichtchromatographie (DC):** Alufolien *Kieselgel 60 F<sub>254</sub>*, Schichtdicke 0.2 mm, *Merck*. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung im UV und/oder durch Anfärben mit folgenden Reagenzien:  
-Räuchern mit konz. Salzsäure. Dimethoxytritylgeschützte Verbindungen färben orangerot.

-Einwirken einer Lösung von 2 g Phosphormolybdänsäure und 1 g Cer(IV)sulfat in 10 ml konz. Schwefelsäure und 90 ml Wasser. Oxidierbare Verbindungen färben nach Erwärmen blau.

**Flash-Chromatographie:** *Kieselgel 60* (40-63  $\mu\text{m}$ , 230-400 mesh) *Merck*. Alkalisierendes Kieselgel erhielt man durch Zusatz von Triethylamin (1-5%) im Laufmittel während des Aufschlammens.

**Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):**

*Jasco* HPLC-System mit Pumpe *Jasco PU-980*, Gradientenmischer *Jasco LG-980-02* und Entgaser *Jasco DG-980-50*.

Detektoren: UV-Detektor *Jasco UV-970* und Fluoreszenzdetektor *Jasco FP-920*. Säulen: *Merck LiChrospher 100 RP-18* (5  $\mu\text{m}$ ), 125\*4 mm, endcapped, *Bischoff Prontosil 120-5-C18 H* 5  $\mu\text{m}$ , *Bischoff Prontosil 120-5 OD SAQ*, 5.0  $\mu\text{m}$ . Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mittels des Softwarepaketes *Borwin (JMBS Development)* Version 1.22 unter *Microsoft Windows95*.

**Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):**

*Merck SepTech*, mit *Merck/Hitachi L4000A* UV-Detektor und *SepTech/Knauer* präparativer RI-Detektor, Säulen 500 x 50 mm und 250 x 50 mm Innendurchmesser, gepackt mit Säulenfüllstand *Merck NW50*, stationäre Phase *Mackerey und Nagel Nucleoprep 20  $\mu\text{m}$* , *Servogar SE120* Zweikanalkompensationsschreiber.

**Thermostat:** *Lauda RM6* und *RC6* (Präzision der Temperaturkontrolle  $\pm 0.05$  C).

**Zentrifugen:** Kühlbare Tischzentrifugen *Hettich EBA 12R* und *Eppendorf 5417R*, Minizentrifuge *1201 (National Lab)*.

**Autoklav:** Laborautoklav *Roth Modell 1*, Reaktionsgefäßvolumen 100 ml, max. Betriebsdruck 100 bar, max. Betriebstemperatur 300°C.

**Lyophilisierung:** *Christ Alpha 2-4*.

**Heizblock:** *Biometra TB1 Thermoblock*.

**DNA-/RNA-Synthesizer:** *Applied Biosystems ABI 381A* und *Eppendorf Ecosyn D300+*.

**DNA-/RNA-Sequencer:** *ALFExpress* (Pharmacia) mit Steuersoftware *ALFWin* Version 2.1 und Auswertesoftware *AlleleLinks* Version 2.1 unter *Microsoft Windows95*.

**SpeedVac:** Vakuumeinheit *Savant UVS 400A*, *Savant SpeedVac Plus SC 110A*.

**Ausgangsverbindungen** deren Darstellungen nicht beschrieben sind, wurden von den Firmen *Aldrich*, *Sigma*, *Fluka*, *Merck*, *Lancaster* oder *Roth* bezogen.

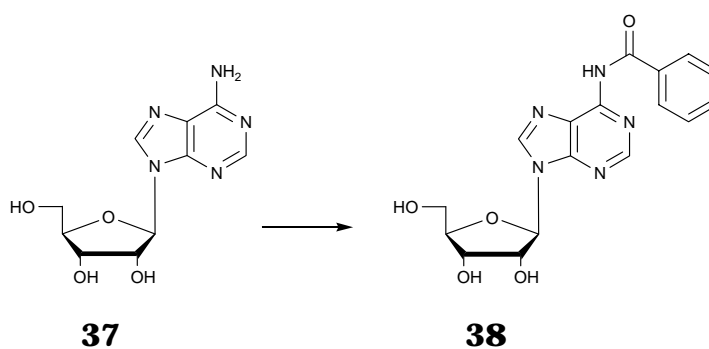
**Lösungsmittel:** Lösungsmittel für die Chromatographie wurden destilliert, Lösungsmittel für Reaktionen wurden nach den üblichen Methoden gereinigt bzw. absolutiert.

**Steriles Arbeiten:** Um Kontamination mit RNasen vorzubeugen, wurden bei allen Experimenten mit Nucleinsäuren sterile Einmalgeräte oder autoklavierte (30 min. bei 121°C) Plastikgeräte verwendet. Steriles Wasser wurde durch Behandlung von Millipore-Wasser mit 0.1 % (v/v) DEPC über Nacht bei RT und anschließendem Autoklavieren (30 min. bei 121°C) hergestellt. Die Reaktionspuffer wurden mit sterilem Wasser angesetzt und nochmals autoklaviert. Nucleinsäure-Stammlösungen wurden mit sterilem Wasser angesetzt. Während der Durchführung der Oligomerisierungsexperimente wurden Latex Einmalhandschuhe getragen.

## 7.2 Synthese der Monomere

### 7.2.1 Adenosin-Phosphoramidit

#### 7.2.1.1 Synthese von 2-N-Benzoyladenosen 38



Bei RT und unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre wurden zu einer Suspension aus 13.3 g Adenosin 37 (50 mmol) in 350 ml trockenem Pyridin 50.7 ml TMS-Cl (400 mmol, 8 eq.) getropft. Nach 3 h Rühren fügte man bei 0°C innerhalb von 15 min. 17.5 ml Benzoylchlorid (150 mmol, 3 eq.) tropfenweise zu, ließ noch weitere 20 min. rühren und erwärmte dann auf RT. Nach 2 h versetzte man die Lösung mit 50 ml Wasser und 100 ml NH<sub>4</sub>OH (25%) und verteilte die Lösung nach 15 min. zwischen 800 ml Wasser und 150 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Man engte die wässrige Phase anschließend bis zur beginnenden Kristallisation im Vakuum ein und bewahrte den geschlossenen Kolben über Nacht bei 4°C auf, um die Kristallisation zu vervollständigen. Nach dem Entfernen des Überstandes durch Filtration und nach der Trocknung des Niederschlags erhielt man 11.1 g (32.5 mmol, 65 %) farblose Kristalle von 38.

**DC:** EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O = 20:5:4:1  $R_f$  = 0.55

**Schmp.:** 133-134°C (H<sub>2</sub>O) Lit. [83]: 134-135°C (H<sub>2</sub>O)

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 3.33 (s, 0.6 x H<sub>2</sub>O), 3.55-3.62, 3.66-3.72 (m, 2H, 5'-H), 3.98 (m, 1H, 4'-H), 4.19 (m, 1H, 3'-H), 4.66 (dd, J=11.0 Hz,

10.0 Hz, 1H, 2'-H), 5.13 (t, 1H, J=5.7 Hz, 5'-OH), 5.25 (d, 1H, J=4.9 Hz, 3'-OH), 5.56 (d, 1H, J=6.1 Hz, 2'-OH), 6.04 (d, 1H, J=5.8 Hz, 1'-H), 7.55 (t, 2H, J=8.6 Hz, *m*-Bz-H), 7.62-7.68 (m, 1H, *p*-Bz-H), 8.05 (d, 2H, J=8.0 Hz, *o*-Bz-H), 8.74 (s, 1H, 2-H), 8.76 (s, 1H, 8-H), 11.20 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3442w, 3135s, 3278s, 3116m, 2940w, 1702s, 1616s, 1464s, 1361w, 1265s, 1168w, 1136w, 1064s, 964m, 196w, 708m, 640w

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> Mr = 371.35

ber.: C 54.98 H 4.61 N 18.86

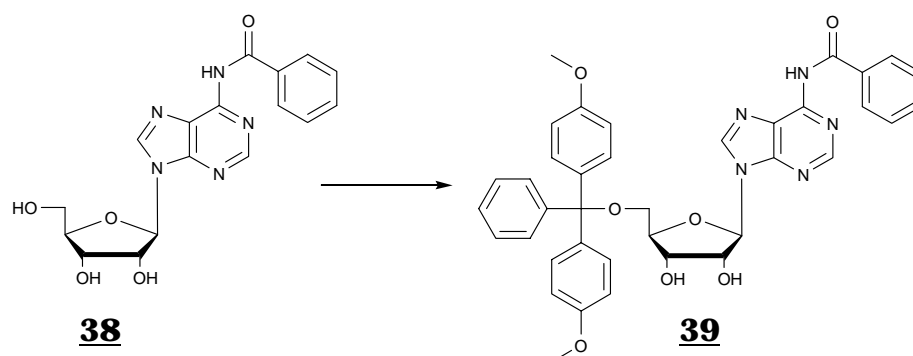
ber. x 0.6 H<sub>2</sub>O: C 53.43 H 4.80 N 18.27

gef.: C 52.23 H 4.88 N 18.33

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 371.1

gef.: 372.1

#### 7.2.1.2 Synthese von 2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-adenosin **39**



Unter einer Argonatmosphäre löste man in 90 ml trockenem Pyridin 9.28 g 2-N-Benzoyl-Adenosin **38** (25 mmol) und fügte 100 mg DMAP (0.80 mmol, 0.03 eq.) sowie 10.15 g DMT-Cl (30 mmol, 1.2 eq.) bei RT zu. Nach 12 h Rühren versetzte man mit 10 ml MeOH, entfernte das Lösungsmittel im Vakuum und ko-evaporierte dreimal mit Toluol. Der entstandene gelbliche Schaum wurde durch Flash-Chromatographie mit Aceton/Toluol = 3:2 aufgereinigt. Die Ausbeute von **39** betrug 12.63 g (18.75 mmol, 75 %) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:** Aceton/Toluol R<sub>f</sub> = 0.25



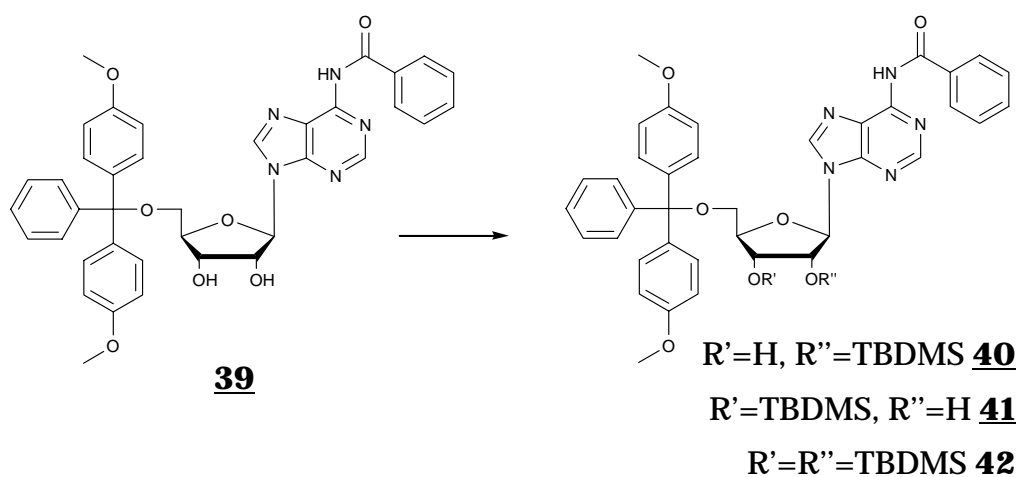
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 3.21-3.25 (m, 2H, 5'-H), 3.33 (s, 0.5 H<sub>2</sub>O), 3.71 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.12 (m, 2H, 4'-H, 3'-H), 4.33 (m, 1H, 2'-H), 4.78 (m, 1H, 1'-H), 5.29 (d, 1H, J=3.0 Hz, 3'-OH), 5.65 (d, 1H, J=4.8 Hz, 2'-OH), 6.07 (d, 1H, J=5.5 Hz, 1'-H), 6.83 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.16-7.38 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.52-7.68 (m, 3H, *m*-Bz-H, *p*-Bz-H), 8.04 (d, 2H, J=7.1 Hz, *o*-Bz-H), 8.60 (s, 1H, 2-H), 8.69 (s, 1H, 8-H), 11.23 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3386s, 3060m, 2931s, 3835w, 1702s, 1610s, 1582s, 1509s, 1462s, 1409w, 1299m, 1252s, 1177s, 1074m, 1032s, 1001w, 901m, 828s, 797s, 706s, 645m

**EA:** C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> Mr = 673.71  
 ber.: C 67.74 H 5.24 N 10.40  
 ber. x 0.5 H<sub>2</sub>O: C 66.85 H 5.31 N 10.26  
 gef.: C 66.81 H 5.18 N 10.17

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>38</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: 673.3  
 gef.: 674.5

### 7.2.1.3 Silylierung von 2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-adenosin **39** mit TBDMS-Cl



Unter einer Argonatmosphäre wurden zu einer Lösung von 11.82 g der Ausgangsverbindung **39** (15 mmol) und 4.08 g Imidazol (60 mmol, 4.0 eq.) in 100 ml abs. DMF 2.70 g (18 mmol, 1.2 eq.) TBDMS-Cl gegeben. Nach Rühren

über Nacht bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit 400 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 100 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum vollständig eingeeengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 1:1 aufgereinigt wurde. Die Ausbeute des 2'-O-TBDMS-Derivats **40** betrug 5.32 g (6.75 mmol, 45 %), des 3'-O-TBDMS-Derivats **41** 8 g (4.8 mmol, 32 %) und des bisilylierten Isomers **42** 9.95 g (1.05 mmol, 7 %).

**2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-tert-butylldimethylsilyl-adenosin 40**

**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1  $R_f$  = 0.40

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = -0.02, 0.00 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.79 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.30-3.37 (m, 2H, 5'-H), 3.74 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.16 (m, 1H, 4'-H), 4.31 (m, 1H, 3'-H), 4.92 (m, 1H, 2'-H), 5.22 (d, 1H, J=6.0 Hz, 3'-OH), 6.10 (d, 1H, J=4.9 Hz, 1'-H), 6.87 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.22-7.43 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.57 (t, 2H, J=8.5 Hz, *m*-Bz-H), 7.64-7.70 (m, 1H, *p*-Bz-H), 8.06 (d, 2H, J=7.0 Hz, *o*-Bz-H), 8.62 (s, 1H, 2-H), 8.69 (s, 1H, 8-H), 11.23 (br. s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3408m, 3060w, 2951s, 2930s, 2856m, 1707s, 1610s, 1582s, 1509s, 1456s, 1407w, 1328w, 1299m, 1251s, 1177s, 1070w, 1033w, 912m, 865w, 836s, 783m, 755w, 705m, 645w, 584w

**EA:** C<sub>44</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si  $Mr$  = 787.97  
ber.: C 67.07 H 6.27N 8.89  
gef.: C 66.87 H 6.27N 8.81

**2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-tert-butylldimethylsilyl-adenosin 41**

**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1  $R_f$  = 0.25

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 0.00, 0.04 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.80 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.12-3.24, 3.29-3.31 (m, 2H, 5'-H), 3.67 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>),

4.02 (m, 1H, 4'-H), 4.42 (m, 1H, 3'-H), 4.85 (m, 1H, 2'-H), 5.44 (d, 1H, J=6.1 Hz, 2'-OH), 6.97 (d, 1H, J=5.4 Hz, 1'-H), 6.81 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.16-7.32 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.49 (t, 2H, J=8.5 Hz, *m*-Bz-H), 7.56-7.59 (m, 1H, *p*-Bz-H), 7.98 (d, 2H, J=8.0 Hz, *o*-Bz-H), 8.58 (s, 1H, 2-H), 8.60 (s, 1H, 8-H), 11.15 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3407s, 3060w, 2952s, 2856s, 2364w, 1706s, 1610s, 1582s, 1509s, 1457s, 1410w, 1327w, 1299m, 1252m, 1177m, 1071m, 1034m, 935w, 829s, 784m, 705s, 646s, 583s

**EA:** C<sub>44</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si      Mr = 787.97  
 ber.: C 67.07      H 6.27      N 8.89  
 gef.: C 66.86      H 6.28      N 8.88

**2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2',3'-di-O-tert-butylldimethylsilyl-adenosin 42**

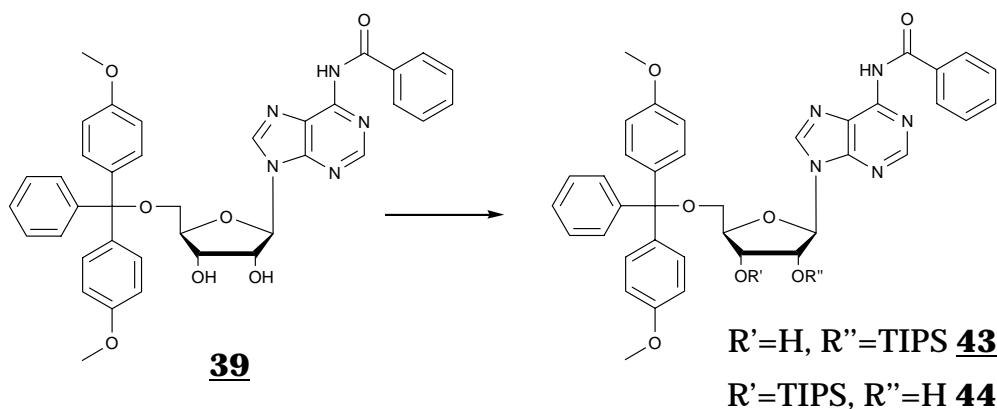
**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1      R<sub>f</sub> = 0.70

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -0.06-0.00 (4s, 12H, 4 Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.66 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.15-3.21, 3.38-3.44 (m, 2H, 5'-H), 3.65 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.06 (m, 1H, 4'-H), 4.30 (m, 1H, 3'-H), 4.92 (m, 1H, 2'-H), 5.95 (d, 1H, J=6.0 Hz, 1'-H), 6.80 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.14-7.44 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.46 (t, 2H, J=8.5 Hz, *m*-Bz-H), 7.54-7.59 (m, 1H, *p*-Bz-H), 7.98 (d, 2H, J=8.0 Hz, *o*-Bz-H), 8.56 (s, 1H, 2-H), 8.60 (s, 1H, 8-H), 11.13 (br. s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3412w, 3061w, 2953s, 2930s, 2857m, 1708s, 1601s, 1582s, 1509s, 1456s, 1409w, 1302m, 1252s, 1176s, 1070m, 1036m, 1002w, 962w, 836s, 778s, 705s, 645w, 583m

**EA:** C<sub>50</sub>H<sub>63</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub>      Mr = 902.24  
 ber.: C 66.56      H 7.04      N 7.76  
 gef.: C 66.64      H 6.83      N 7.60

#### 7.2.1.4 Silylierung von 2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-adenosin **39** mit TIPS-Cl



Unter Argon löste man 11.82 g des geschützten Adenosins **39** (15 mmol) und 2.66 g Imidazol (39 mmol, 2.6 eq.) in 50 ml abs. DMF. Dazu tropfte man bei RT 4.13 ml (3.76 g, 19.5 mmol, 1.3 eq.) TIPS-Cl und ließ über Nacht rühren. Dann versetzte man das Reaktionsgemisch mit 200 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und extrahierte dreimal mit je 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 50 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 1:1 aufgereinigt wurde. Isoliert wurden vom 2'-O-TBDMS-Regioisomer **43** 6.85 g (8.25 mmol, 55 %) und vom 3'-O-TBDMS-Regioisomer **44** 3.98 g (4.8 mmol, 32%).

#### 2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl-adenosin **43**

**DC:** EtOAc/n-Hexan = 1:1  $R_f = 0.44$

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta = 0.83\text{--}1.01$  (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 3.20–3.33 (m, 2H, 5'-H), 3.72 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.17 (m, 1H, 4'-H), 4.33 (m, 1H, 3'-H), 5.12 (m, 1H, 2'-H), 5.24 (d, 1H, J=6.0 Hz, 3'-OH), 6.12 (d, 1H, J=5.3 Hz, 1'-H), 6.85 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.23–7.42 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.54 (t, 2H, J=8.5 Hz,

*m*-Bz-H), 7.62-7.64 (m, 1H, *p*-Bz-H), 8.04 (d, 2H, *J*=8.0 Hz, *o*-Bz-H), 8.63 (s, 1H, 2-H), 8.65 (s, 1H, 8-H), 11.22 (br. s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3529w, 3411m, 3060w, 1943s, 2866m, 2837w, 2045w, 1968w, 1900w, 1707s, 1602s, 1582s, 1509s, 1456s, 1411w, 1390w, 2328w, 1299m, 1251s, 1177m, 1155w, 1090w, 1070w, 1034m, 999w, 915w, 882m, 828s, 798w, 755m, 704s, 687w, 646w, 583m

**EA:** C<sub>47</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si      Mr = 830.05  
 ber.: C 68.01      H 6.68      N 8.44  
 gef.: C 67.46      H 6.54      N 8.22

**2-N-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyl-adenosin 44**

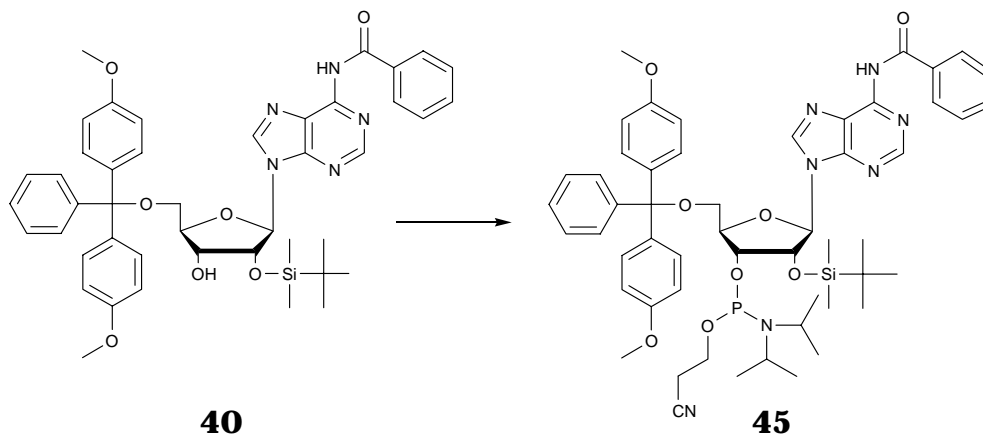
**DC:** EtOAc/n-Hexan = 1:1      R<sub>f</sub> = 0.28

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 1.02-1.10 (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 3.21-3.32, 3.38-3.43 (m, 2H, 5'-H), 3.72 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.14 (m, 1H, 4'-H), 4.63 (m, 1H, 3'-H), 4.97 (m, 1H, 2'-H), 5.48 (d, 1H, *J*=5.8 Hz, 2'-OH), 6.05 (d, 1H, *J*=5.5 Hz, 1'-H), 6.84 (dd, 4H, *J*=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.20-7.38 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.55 (t, 2H, *J*=8.5 Hz, *m*-Bz-H), 7.61-7.66 (m, 1H, *p*-Bz-H), 8.04 (d, 2H, *J*=8.0 Hz, *o*-Bz-H), 8.62 (s, 1H, 2-H), 8.64 (s, 1H, 8-H), 11.19 (br. s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3408s, 3060w, 2943s, 2865m, 2837w, 2046w, 1897w, 1706s, 1610s, 1582s, 1509s, 1456s, 1412w, 1390w, 1327w, 1299m, 1252s, 1177m, 1154w, 1070wm, 1033w, 999w, 883m, 828s, 792m, 754m, 726w, 705m, 685w, 646w, 584m

**EA:** C<sub>47</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si      Mr = 830.05  
 ber.: C 68.01      H 6.68      N 8.44  
 gef.: C 67.57      H 6.40      N 8.21

### 7.2.1.5 Synthese von 2-N-Benzoyl-3'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-tert-butyldimethylsilyl-adenosin **45**



Eine Mischung von 5.93 g des geschützten Adenosinderivats **40** (6 mmol) und 73 mg (0.6 mmol, 0.1 eq.) DMAP wurde dreimal mit je 5 ml abs. THF ko-evaporiert und anschließend in 10 ml abs. THF unter Argonatmosphäre bei RT gelöst. Hierzu wurden nacheinander 4.1 ml frisch destillierte Hünig-Base (3.10 g, 24 mmol, 4.0 eq.) und 1.71 g (7.2 mmol, 1.2 eq.) Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorphosphin gegeben. Nach 4 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 30 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 30 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 1:1 + 5 % NEt<sub>3</sub> aufgereinigt wurde. Die Ausbeute von **45** (2 Diastereomere) betrug 5.04 g (5.1 mmol, 85 %) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1 + 5 % NEt<sub>3</sub>  $R_f$  = 0.45, 0.52

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = -0.26, -0.25 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09-0.06 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.72, 0.73 (2s, 18H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.17 (2m, 24H, Isopropyl-CH<sub>3</sub>), 2.56, 2.79 (2t, 4H, J=6.1 Hz, CH<sub>2</sub>-CN), 3.28-3.45 (2m, 4H, Isopropyliden-CH), 3.54-3.70 (m, 4H, 5'-H), 3.73 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (m, 4H, Cyanethoxy-OCH<sub>2</sub>), 4.28, 4.36 (2m, 2H, 4'-H), 4.44 (m, 2H,

3'-H), 5.19 (t, J=5.1 Hz, 2H, 2'-H), 6.06 (2d, 2H, J=6.1 Hz, 1'-H), 6.86 (dd, 8H, J=8.9 Hz, 1.9 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.20-7.44 (m, 18H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.55, 7.64 (2t, 4H, J=8.5 Hz, *m*-Bz-H), 7.61-7.66 (m, 2H, *p*-Bz-H), 8.05 (d, 4H, J=8.2 Hz, *o*-Bz-H), 8.58, 8.61 (2s, 2H, 2-H), 8.63, 8.64 (2s, 2H, 8-H), 11.20 (br. s, 2H, NH) (2 Diastereomere)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 149.4, 150.9 im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3421w, 3060w, 2964s, 2931s, 2858w, 1706m, 1654w, 1609s, 1582m, 1509s, 1458s, 1399w, 1364w, 1328w, 1301m, 1252s, 1223w, 1178s, 1156m, 1127w, 1073m, 1036m, 980m, 921w, 877w, 836m, 784m, 754w, 706m, 644w, 883m

**EA:** C<sub>53</sub>H<sub>66</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>PSi Mr= 988.19

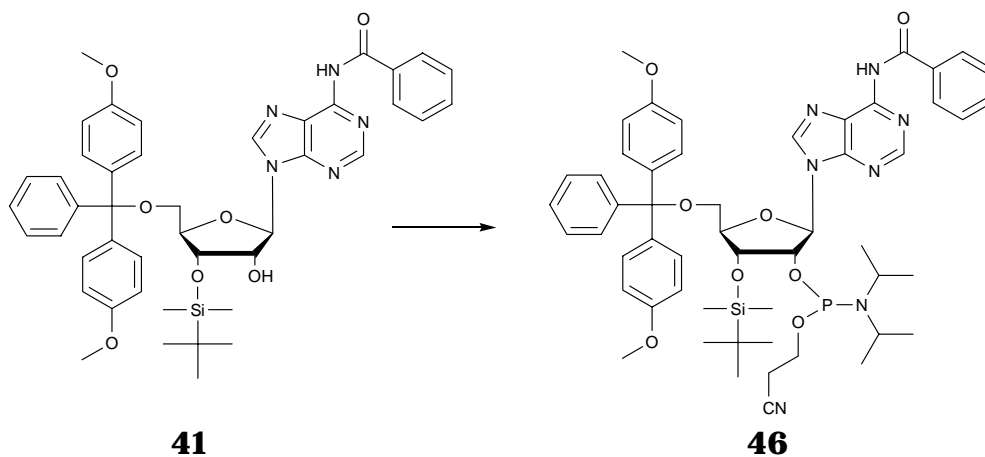
ber.: C 64.42 H 6.73 N 9.92

gef.: C 63.62 H 6.60 N 9.69

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>53</sub>H<sub>66</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>PSi: 987.5

gef.: 988.8

**7.2.1.6 Synthese von 2-N-Benzoyl-2'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-tert-butyldimethylsilyl-adenosin 46**



Eine Mischung von 3.95 g des geschützten Adenosins **41** (4 mmol) und 49 mg (0.4 mmol, 0.1 eq.) DMAP wurde dreimal mit je 5 ml abs. THF koevaporiert und anschließend in 10 ml abs. THF unter einer Argonatmosphäre bei RT gelöst. Hierzu wurden nacheinander 2.8 ml frisch destillierte Hünig-Base (2.07 g, 16 mmol, 4.0 eq.) und 1.14 g (4.8 mmol, 1.2 eq.) Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorphosphin gegeben. Nach 4 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 15 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 15 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 1:1 + 5 % NEt<sub>3</sub> aufgereinigt wurde. Die Ausbeute des Phosphoramidits **46** (2 Diastereomere) betrug 3.12 g (3.16 mmol, 79 %) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1 + 5 % NEt<sub>3</sub>  $R_f$  = 0.41, 0.49

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 0.06, 0.08 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.10, 0.15 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.83, 0.85 (2s, 18H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.06 (m, 24H, Isopropyl-CH<sub>3</sub>), 2.57, 2.72 (2t, 4H, J=6.3 Hz, CH<sub>2</sub>-CN), 3.15, 3.45 (2m, 4H, Isopropyliden-CH), 3.50-3.60 (m, 4H, 5'-H), 3.72 (2s, 12H, OCH<sub>3</sub>),



4.11 (m, 4H, Cyanethoxy-OCH<sub>2</sub>), 4.75 (2m, 2H, 4'-H), 5.05 (2m, 2H, 3'-H), 5.12 (m, 2H, 2'-H), 6.19, 6.25 (2d, 2H, J=6.2 Hz, 1'-H), 6.83 (dd, 8H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.19-7.37 (m, 18H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.54, 7.64 (2t, 4H, J=8.5 Hz, *m*-Bz-H), 8.03 (m, 2H, *p*-Bz-H), 8.05 (2d, 4H, J=8.2 Hz, *o*-Bz-H), 8.65, 8.66 (2s, 2H, 2-H), 8.70 (2s, 2H, 8-H), 11.19 (br. s, 2H, NH) (2 Diastereomere)

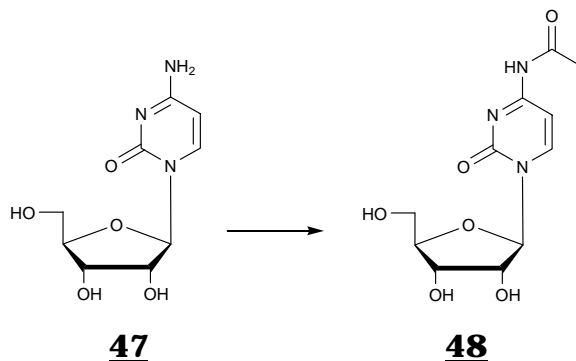
**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 151.0, 150.4 im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3411w, 3061w, 2964s, 1931s, 2857w, 1706s, 1609s, 1582s, 1509s, 1458s, 1397w, 1364w, 1301m, 1252s, 1201w, 1178m, 1155w, 1117w, 1074m, 1037m, 979m, 937w, 867w, 935s, 780m, 754w, 706s, 643w, 583m

<b>EA:</b>	C <sub>53</sub> H <sub>66</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> PSi	Mr= 988.19
ber.:	C 64.42	H 6.73N 9.92
gef.:	C 64.33	H 6.72N 9.73

### 7.2.2 Synthese des Cytidin-Phosphoramidits

#### 7.2.2.1 Acetylierung zu 4-N-Acetyl-cytidin 48



Eine Suspension von 12.16 g Cytidin **47** (50 mmol) in 500 ml EtOH und 4.9 ml Essigsäureanhydrid (5.11 g, 50 mmol, 1 eq.) wurde unter Argon zum Sieden erhitzt. Nach 1, 3 und 4 h erfolgte eine erneute Zugabe von jeweils 4.9 ml Essigsäureanhydrid (5.11 g, 50 mmol, 1 eq.) Nach weiteren 2 h erfolgte die Kristallisation bei  $-18^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Die abfiltrierten Kristalle wurden mit

EtOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 13.12 g (45.0 mmol, 92 %) des Produktes **48** in Form farbloser Kristalle.

**DC:** EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc = 16:4:4:1  $R_f$  = 0.44

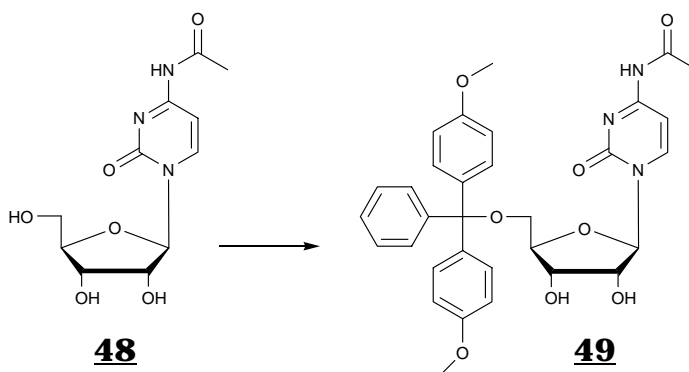
**Schmp.:** 207-208°C (MeOH) Lit. [83]: 208-209 (MeOH)

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.55-3.78 (m, 2H, 5'-H), 3.89-4.01 (m, 3H, 2'-H, 3'-H und 4'-H), 5.02 (d, J=5.5 Hz, 1H, 1'-H), 5.12 (t, J=5.1 Hz, 1H, 3'-OH), 5.44 (d, J=4.7 Hz, 1H, 2'-OH), 5.78 (d, J=2.6 Hz, 1H, 5'-OH), 7.17 (d, J=7.5 Hz, 1H, 5H oder 6H), 8.40 (d, J=7.5 Hz, 1H, 5H oder 6H), 10.84 (s, 2H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3471m, 3261s, 2936w, 2842m, 1717s, 1642s, 1638s, 1584m, 1491s, 1431m, 1399m, 1306m, 1228m, 1228s, 1194w, 1132w, 1112w, 1020s, 938w, 967m, 860w, 817m, 788m, 741w, 686s, 654m, 591m

**EA:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> Mr = 285.25  
ber. C 46.32 H 5.30 N 14.73  
gef.: C 46.47 H 5.30 N 14.67

#### 7.2.2.2 Synthese von 4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-cytidin **49**



Unter Argon löste man in 100 ml trockenem Pyridin und 100 ml abs. DMSO 11.4 g des 4-N-Acetyl-geschützten Cytidins **48** (40 mmol) und fügte 100 mg DMAP (0.08 mmol, 0.02 eq.) zu. Nach der Zugabe von 17.57 g DMT-Cl (52 mmol, 1.3 eq.) in Portionen ließ man 12 h bei RT rühren. Dann versetzte man mit 10 ml MeOH, entfernte das Lösungsmittel im Vakuum, koevaporierte

dreimal mit Toluol und nahm den Rückstand in 175 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf. Die organische Phase wurde dreimal mit je 150 ml ges. aq. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Der verbliebene gelbliche Schaum wurde mittels Flash-Chromatographie mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1 aufgereinigt. Man erhielt 17.62 g (30 mmol, 75 %) von **49** eines farblosen Schaums.

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.26

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.32 (m, 2H, 5'-H), 3.75 (s, 9H, OCH<sub>3</sub>), 4.00–4.15 (m, 3H, 2'-H, 3'-H und 4'-H), 5.11 (d, J=6.0 Hz, 1H, 3'-OH), 5.64 (m, 1H, 2'-OH), 5.76 (s, 0.2 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 5.77 (d, J=1.6 Hz, 1H, 1'-H), 6.90 (d, J=8.9 Hz, 4H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.01 (d, J=7.4 Hz, 1H, 5-H oder 6-H), 8.29 (d, J=7.5 Hz, 1H, 5-H oder 6-H), 10.88 (s, 1H, NH)

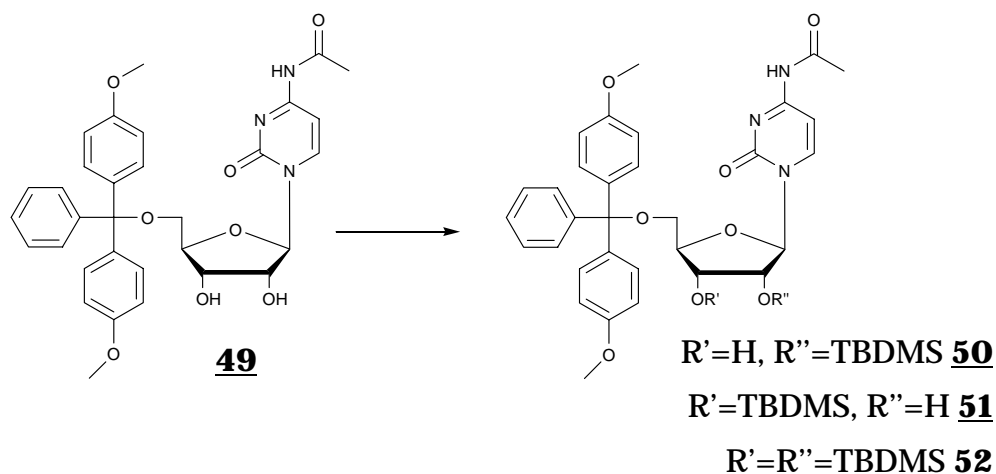
**FT-IR (KBr):** 3295s, 3066w, 2932m, 2836m, 1719m, 1649s, 1609s, 1563m, 1508s, 1491s, 1443m, 1378m, 1306s, 1249s, 1176s, 1106m, 1033s, 914w, 828s, 790m, 756w, 701w, 587m

**EA:** C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>0</sub>      Mr = 587.62

ber.:	C 65.41	H 5.66	N 7.15
ber. x 0.2 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :	C 64.20	H 5.58	N 6.98
gef.:	C 63.97	H 5.57	N 6.95

**ESI-MS:** ber. für C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>0</sub>: 587.3  
gef.: 586.4

### 7.2.2.3 Silylierung von 4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-cytidin **49** mit TBDMS-Cl



Zu einer Lösung von 14.69 g des geschützten Cytidin-Derivats **49** (25 mmol) und 4.42 g Imidazol (65 mmol, 2.6 eq.) in 100 ml abs. DMF wurden unter einer Argonatmosphäre bei RT 4.9 g (32.5 mmol, 1.3 eq.) TBDMS-Cl in Portionen gegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch mit 100 ml 5 %iger aq.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt und dreimal mit je 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 50 ml ges. aq. NaCl-Lösung gewaschen, anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 2:1 aufgereinigt wurde. Es konnten 7.37 g (10.50 mmol, 42 %) des 2'-O-TBDMS-Regioisomers **50**, 6.14 g (8.75 mmol, 35 %) des 3'-O-TBDMS-Regioisomer **51** und 1.63 g (2.0 mmol, 8 %) des doppelt geschützten Produkts **52** isoliert werden.

#### 4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-cytidin **50**

**DC:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$   $R_f = 0.70$

**$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta = 0.09, 0.12$  (2s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.88 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.10 (s, 3H, Ac- $\text{CH}_3$ ), 3.35 (m, 2H, 5'-H), 3.75 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.05 (m, 1H, 4'-H), 4.13 (m, 2H, 2'-H, 3'-H), 5.10 (d, 1H,  $J=6.1$  Hz,

3'-OH), 5.73 (d, 1H,  $J=2.6$  Hz, 1'-H), 6.91 (dd, 4H,  $J=9.0$  Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.01 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, 5-H), 7.26-7.41 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 8.29 (d, 1H,  $J=7.4$  Hz, 6-H), 10.85 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3546w, 3234w, 3069w, 2953s, 2929s, 2856m, 1723m, 1671s, 1609s, 1560s, 1509s, 1492s, 1444m, 1382m, 1306m, 1252s, 1176m, 1034m, 1004w, 914w, 831s, 790m, 756w, 726w, 702m, 668w, 586s

**EA:** C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si      Mr = 701.88  
 ber.: C 65.03      H 6.75      N 5.99  
 gef.: C 64.76      H 6.76      N 5.76

**4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-cytidin 51**

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.50

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 0.01, 0.04 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.72 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 3.20-3.28, 3.52-3.60 (m, 2H, 5'-H), 3.74 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.04-4.13 (m, 2 H, 4'-H, 3'-H), 4.29 (m, 1H, 2'-H), 5.50 (d, 1H,  $J=6.7$  Hz, 2'-OH), 5.83 (d, 1H,  $J=2.3$  Hz, 1'-H), 6.90 (dd, 4H,  $J=9.0$  Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.04 (d, 1H,  $J=7.5$  Hz, 5-H), 7.20-7.41 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 8.39 (d, 1H,  $J=7.5$  Hz, 6-H), 10.91 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3243w, 3062w, 2952s, 2931s, 2836w, 1722m, 1662s, 1608m, 1559s, 1490s, 1444w, 1304m, 1252s, 1177m, 1111w, 1034m, 999m, 913w, 829s, 789m, 755s, 703m, 669w, 632w, 585s

**EA:** C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si      Mr = 701.88  
 ber.: C 65.03      H 6.75      N 5.99  
 gef.: C 69.11      H 6.10      N 4.82

**ESI-MS:** ber. für C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si: 701.0  
 gef.: 700.8

**4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2',3'-di-O-*tert*-butyldimethylsilyl-cytidin 52**

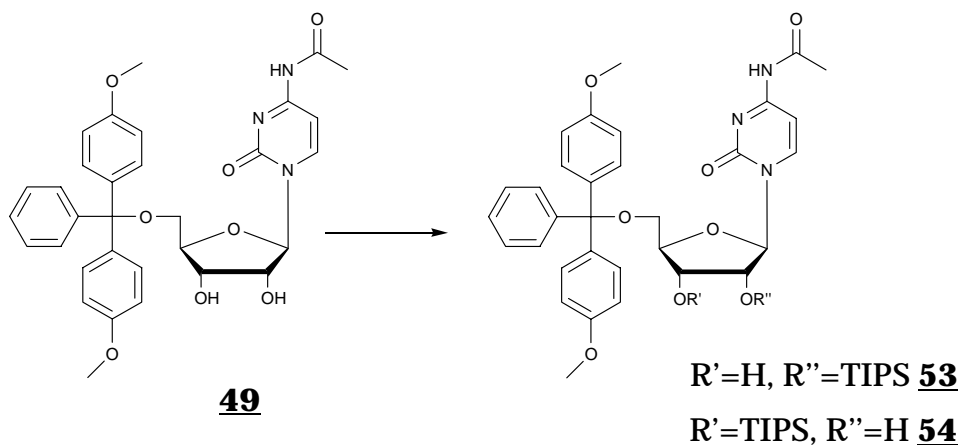
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.60

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = -0.09, -0.06, -0.02, 0.00 (4s, 12H, Si-CH<sub>3</sub>), 0.70, 0.89 (2s, 18H, C-CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 3.23 (m, 2H, 5'-H), 3.77 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.08 (m, 1H, 4'-H), 4.18 (m, 1H, 3'-H), 4.24 (m, 1H, 2'-H), 5.75 (d, 1H, J=2.6 Hz, 1'-H), 6.92 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.04 (d, 1H, J=7.4 Hz, 5-H), 7.25-7.38 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 8.49 (d, 1H, J=7.4 Hz, 6-H), 10.90 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3227w, 3072w, 2953s, 2930s, 2857m, 1723s, 1671s, 1610s, 1559s, 1509s, 1444m, 1385m, 1306s, 1253s, 1175m, 1130w, 1068w, 1001m, 939w, 867w, 836s, 778s, 702m, 670m, 594m

**EA:** C<sub>44</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub> Mr = 816.14  
 ber.: C 64.75 H 7.53 N 5.15  
 gef.: C 64.82 H 7.49 N 5.05

#### 7.2.2.4 Silylierung von 4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-cytidin **49** mit TIPS-Cl



Eine Lösung von 14.69 g des geschützten Cytidins **49** (25 mmol) und 4.43 g Imidazol (65 mmol, 2.6 eq) in 60 ml abs. DMF wurden unter einer Argonatmosphäre bei RT tropfenweise mit 6.9 ml (6.27 g, 32.5 mmol, 1.3 eq) TIPS-Cl versetzt. Nach Rühren über Nacht fügte man zu dem Reaktionsgemisch 150 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und extrahierte dreimal mit je 50 ml EtOAc. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 50 ml ges. aq. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt.

Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 2:1 aufgereinigt wurde. Die Ausbeute an 2'-O-TIPS-Regioisomer **53** betrug 10.23 g (13.75 mmol, 55 %) und an 3'-O-TIPS-Regioisomer **54** 7.81 g (10.50 mmol, 42%) in Form eines farblosen Schaums.

**4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylcytidin **53****

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.63

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 0.91-1.21 (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 2.12 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 3.33 (m, 2H, 5'-H), 3.76 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.09 (m, 1H, 4'-H), 4.17 (m, 1H, 3'-H), 4.32 (m, 1H, 2'-H), 5.17 (d, 1H, J=6.1 Hz, 3'-OH), 5.85 (d, 1H, J=2.6 Hz, 1'-H), 6.91 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.01 (d, 1H, J=7.4 Hz, 5-H), 7.26-7.42 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 8.30 (d, 1H, J=7.4 Hz, 6-H), 10.85 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3546m, 3230w, 3072w, 2944s, 2866m, 2838w, 2047w, 1723m, 1671s, 1625w, 1609m, 1559s, 1509s, 1491s, 1465w, 1444w, 1380m, 1306s, 1252s, 1176m, 1116m, 1062w, 1035w, 1002w, 967w, 916w, 902w, 882m, 828s, 789m, 756w, 726w, 702w, 684m, 586s

**EA:** C<sub>41</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si      Mr = 743.96  
ber.: C 66.19      H 7.18      N 5.65  
gef.: C 65.96      H 7.19      N 5.48

**4-N-Acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylcytidin **54****

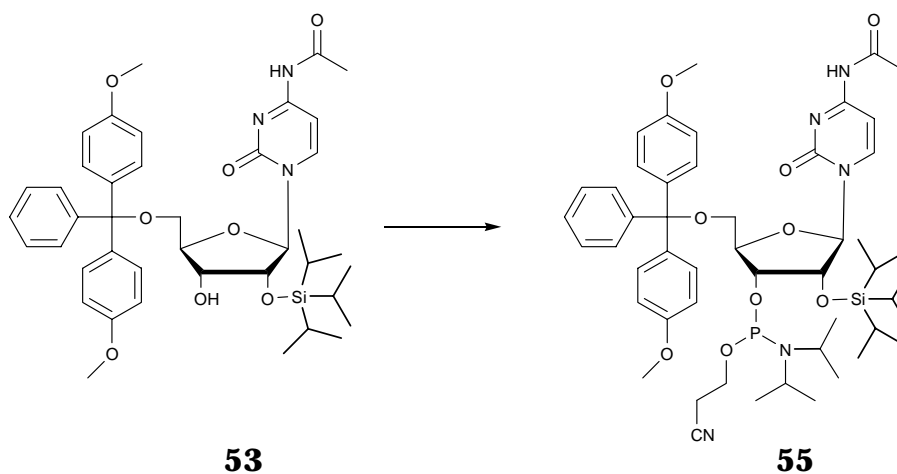
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.46

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 0.83-0.93 (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 2.11 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 3.26 (m, 2H, 5'-H), 3.76 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.08 (m, 1H, 4'-H), 4.12 (m, 1H, 3'-H), 4.28 (m, 1H, 2'-H), 5.48 (d, 1H, J=6.1 Hz, 2'-OH), 5.86 (d, 1H, J=2.6 Hz, 1'-H), 6.90 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.06 (d, 1H, J=7.4 Hz, 5-H), 7.23-7.40 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 8.38 (d, 1H, J=7.4 Hz, 6-H), 10.90 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3236w, 3141w, 3067w, 2943s, 2866m, 2838w, 2553w, 2048w, 1723m, 1664s, 1609m, 1560s, 1509s, 1491s, 1464w, 1445w, 1372m, 1305s, 1251s, 1176m, 1150w, 1111m, 1065m, 1035w, 996m, 916w, 883m, 828s, 790w, 754w, 726w, 684s, 595m

**EA:** C<sub>41</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si      Mr = 743.96  
 ber.: C 66.19      H 7.18      N 5.65  
 gef.: C 65.88      H 7.18      N 5.35

**7.2.2.5 Synthese von 4-N-Acetyl-3'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropyl-cytidin 55**



Eine Mischung von 3.72 g des TIPS-geschützten Cytidins 53 (5 mmol) und 70 mg (0.50 mmol, 0.1 eq) DMAP wurde dreimal mit je 10 ml abs. THF ko-evaporiert und anschließend in 20 ml abs. THF unter einer Argonatmosphäre bei RT gelöst. Hierzu wurden nacheinander 3.5 ml (2.59 g, 20 mmol, 4.0 eq) frisch destillierte Hünig-Base und 1.46 g (6 mmol, 1.2 eq) Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorphosphin gegeben. Nach vierstündigem Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 25 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 25 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 2:1 + 3 % NEt<sub>3</sub> aufgereinigt wurde. Die Ausbeute an dem Cytidin-Phosphoramidit 55



(2 Diastereomere) betrug 5.10 g (5.40 mmol, 77%) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:** EtOAc/Hexan = 2:1 + 3% NEt<sub>3</sub>  $R_f$  = 0.27, 0.35

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 0.91-1.19 (m, 66H, Si-Isopropyl-H, Isopropyl-CH<sub>3</sub>), 2.08, 2.09 (2s, 6H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.49-2.54 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CN), 3.25-3.78 (m, 12H, Isopropyliden-CH, 5'-H, Cyanethoxy-OCH<sub>2</sub>), 3.73, 3.74 (2 s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 4.22-4.31 (m, 4H, 4'-H, 3'-H), 4.48-4.53 (m, 2H, 2'-H), 5.89, 5.90 (2d, 2H, J=2.5 Hz, 1'-H), 6.88 (dd, 8H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.01 (d, 2H, J=7.4 Hz, 5-H), 7.22-7.41 (m, 18H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 8.25, 8.27 (2d, 2H, J=7.4 Hz, 6-H), 10.82, 10.84 (2s, 2H, NH) (2 Diastereomere)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 149.9, 150.0 im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3074w, 1965s, 2931s, 2857w, 1720m, 1670s, 1610s, 1560s, 1509s, 1492s, 1464w, 1445w, 1384s, 1365w, 1307s, 1252s, 1179m, 1154w, 1125m, 1066w, 1037w, 1003w, 980w, 940w, 903w, 878w, 833s, 790w, 756w, 727w, 703w, 670w, 637w, 586s

**EA:** C<sub>50</sub>H<sub>70</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>PSi  $M_r$  = 944.18

ber.: C 63.60 H 7.47 N 7.42

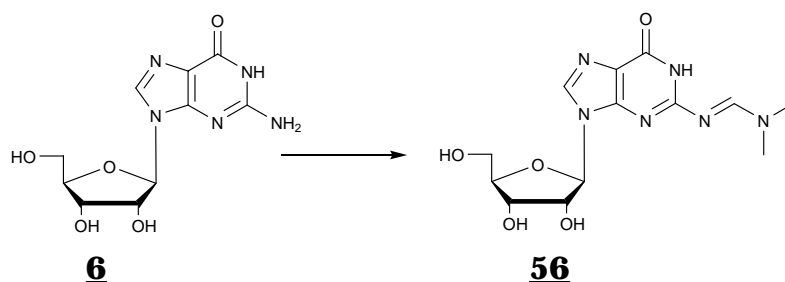
gef.: C 63.62 H 7.49 N 7.34

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>50</sub>H<sub>70</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>PSi: 943.5

gef.: 943.7

## 7.2.3 Synthese des Guanosin-Phosphoramidits

### 7.2.3.1 Herstellung von 2-N-Dimethylformamidino-guanosin **56**



Man suspendierte unter einer Argonatmosphäre 14.16 g Guanosin **6** (50 mmol) in 150 ml abs. DMF, gab 23.3 ml (175 mmol, 3.5 eq.) Dimethylformamiddimethylacetal zu und rührte 24 h bei RT. Anschließend wurde das Lösungsmittel der nun klaren Lösung im Vakuum entfernt, das verbliebene Öl in 500 ml abs. MeOH gelöst. Über Nacht kristallisierte das Produkt bei -18°C in Form farbloser Kristalle aus. Nach dem Trocknen konnte **56** mit 16.24 g (48 mmol, 96 %) erhalten werden.

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 1:1 R<sub>f</sub> = 0.50

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 3.03, 3.16 (2s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.58 (m, 2H, 5'-H), 3.90 (m, 1H, 4'-H), 4.11 (m, 1H, 3'-H), 4.48 (m, 1H, 2'-H), 5.03 (t, J=5.6 Hz, 1H, 5'-OH), 5.19 (d, J=4.5 Hz, 1H, 3'-OH), 5.42 (d, J=6.1 Hz, 1H, 2'-OH), 5.79 (d, J=6.1 Hz, 1H, 1'-H), 8.08 (s, 1H, 8-H), 8.54 (s, 1H, Methyliden-H), 11.35 (s, 1H, 1-NH)

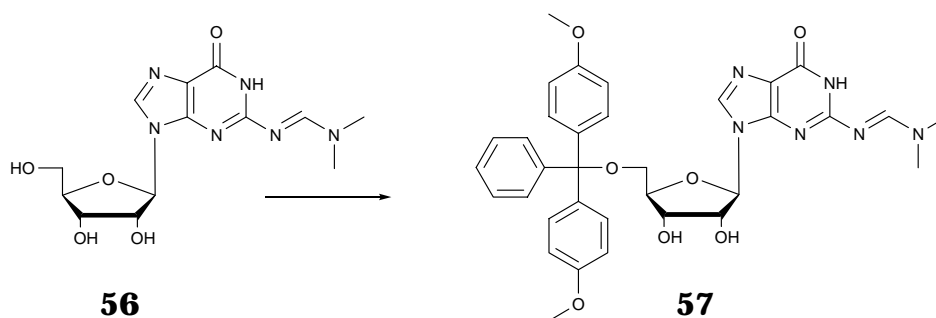
**FT-IR (KBr):** 3365s, 3311s, 3100m, 2912m, 2365w, 1682s, 1636s, 1543s, 1423m, 1356m, 1341m, 1313m, 1241m, 1206w, 1170m, 1124s, 1079w, 1051s, 1015s, 874s, 832w, 787s, 742s, 713w, 651m

**EA:** C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> Mr = 338.32

ber.: C 46.15 H 5.36 N 24.84

gef.: C 45.90 H 5.52 N 24.56

### 7.2.3.2 Tritylierung zu 2-N-Dimethylformamidino-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-guanosin **57**



Zu einer Suspension von 13.52 g der Verbindung **56** (40 mmol) in 100 ml abs. Pyridin wurden unter einer Argonatmosphäre bei RT 17.58 g (52 mmol, 1.3 eq.) DMT-Cl gegeben. Die Suspension wurde für 1 h mit Ultraschall behandelt und anschließend über Nacht gerührt. Das erhaltene klare Reaktionsgemisch wurde mit 10 ml MeOH versetzt, für weitere 5 min. gerührt und anschließend in 2.5 l einer Mischung von Aceton/Diethylether = 1:1 getropft. Der farblose Niederschlag wurde abgesaugt, mit Aceton/Diethylether = 1:1 gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute an **57** betrug 18.20 g (28.4 mmol, 71%).

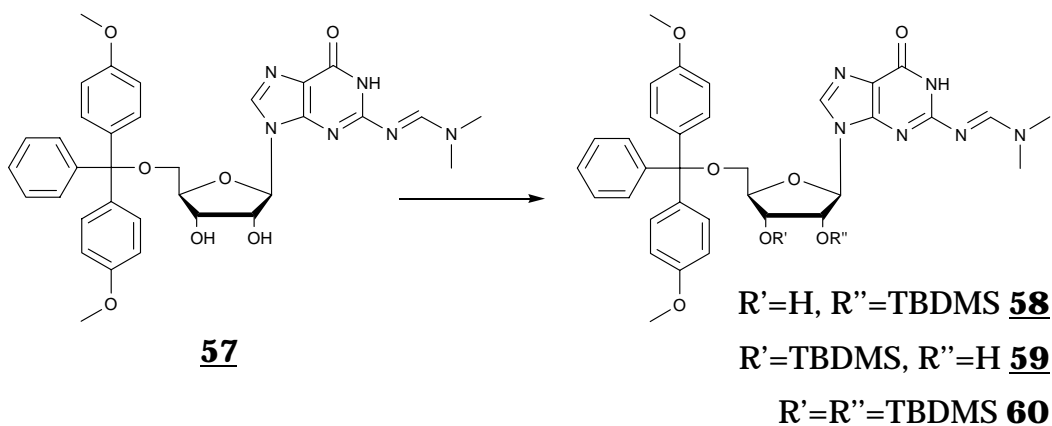
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.44

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 3.03 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.11 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.19 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.01 (m, 1H, 4'-H), 4.23 (m, 1H, 3'-H), 4.52 (m, 1H, 2'-H), 5.21 (d, 1H, J=5.6 Hz, 3'-OH), 5.53 (d, 1H, J=5.6 Hz, 2'-OH), 5.86 (d, 1H, J=4.6 Hz, 1'-H), 6.84 (m, 4H, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.21-7.37 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.96 (s, 1H, 8-H), 8.51 (s, 1H, NCHN), 11.40 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3092m, 1930w, 2836w, 1745w, 1664s, 1628s, 1560w, 1540m, 1509m, 1463w, 1422w, 1342m, 1299w, 1250s, 1180s, 1116s, 1058w, 1036s, 965w, 902w, 866w, 829s, 788w, 760w, 700m, 650w, 583m

**EA:** C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>      Mr = 640.69  
ber.: C 63.74      H 5.66      N 13.12  
gef.: C 63.54      H 5.86      N 13.12

### 7.2.3.3 Einführung der TBDMS-Schutzgruppe an 2-N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-guanosin 57



Unter Argon wurden 16.02 g des geschützten Guanosins 57 (25 mmol) in 100 ml warmem Pyridin gelöst und mit 80 ml abs. DMF und 6.81 g (100 mmol, 4.0 eq.) Imidazol versetzt. Man kühlte auf RT ab, gab portionsweise 7.54 g (50 mmol, 2.0 eq.) TBDMS-Cl zu und ließ über Nacht rühren. Dann wurde das Reaktionsgemisch in 300 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen und die wässrige Phase dreimal mit je 80 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 80 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, im Vakuum bis zur Trockene eingengt und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch präparative HPLC (MeOAc/Dioxan = 10:4, Waters PrepPak 500 Silica; refraktometrisch) aufgereinigt wurde. Die Ausbeute des 2'-O-TBDMS-Regioisomers 58 betrug 7.55 g (10.0 mmol, 40 %), des 3'-O-TBDMS-Regioisomers 59 6.61 g (8.75 mmol, 35 %) und 1.29 g (1.50 mmol, 6 %) des bisilylierten Produktes 60 in Form eines farblosen Schaums.

#### 2-N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimetylsilyl-guanosin 58

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 R<sub>f</sub> = 0.15

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -0.65, 0.00 (2s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.79 (s, 9H, Si-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.02, 3.06 (2s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.26 (m, 1H, 5'-H), 3.73

(s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.05 (m, 1H, 4'-H), 4.17 (m, 1H, 3'-H), 4.57 (t, J=4.7 Hz, 1H, 2'-H), 5.11 (d, J=5.8 Hz, 1H, 3'-OH), 5.87 (d, J=4.5 Hz, 1H, 1'-H), 6.83 (m, 4H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.21-7.40 (m, 9H, Phenyl-H), 7.91 (s, 1H, 8-H), 8.46 (s, 1H, Methyliden-H), 11.35 (s, 1H, 1-NH)

**FT-IR (KBr):** 3260w, 3122w, 2951s, 2929s, 2856m, 1688s, 1632s, 1538s, 1464w, 1424m, 1348s, 1304m, 1251s, 1176m, 1115m, 1033w, 913w, 836s, 784s, 756w, 702m, 645w, 584m

**EA:** C<sub>40</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si      Mr = 754.95  
 ber.: C 63.64      H 6.68      N 11.13  
 gef.: C 63.54      H 6.86      N 10.95

**2-N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert*-butyldimetylsilyl-guanosin 59**

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1   R<sub>f</sub> = 0.10

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -0.06, 0.00 (2s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.75 (s, 9H, Si-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.98, 3.03 (2s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.26 (m, 1H, 5'-H), 3.68 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.90 (m, 1H, 4'-H), 4.26 (t, J=4.9 Hz, 1H, 3'-H), 4.53 (m, 1H, 2'-H), 5.35 (d, J=6.2 Hz, 1H, 2'-OH), 5.78 (d, J=5.0, 1H, 1'-H), 6.79 (m, 4H, *o*-Methoxy-Phenyl-H), 7.16-7.32 (m, 9H, Phenyl-H), 7.92 (s, 1H, 8-H), 8.40 (s, 1H, Methyliden-H), 11.31 (br. s, 1H, 1-NH)

**FT-IR (KBr):** 3402w, 2951s, 2929s, 2856w, 1686s, 1631s, 1608w, 1540s, 1464w, 1423m, 1349s, 1303m, 1251s, 1176s, 1150m, 1115m, 1067w, 1034w, 990w, 935w, 835s, 783s, 755w, 703m, 584m

**EA:** C<sub>40</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si      Mr = 754.95  
 ber.: C 63.64      H 6.68      N 11.13  
 gef.: C 63.43      H 6.69      N 11.18

**2-N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2',3'-di-O-*tert*-butyldimethylsilyl-guanosin 60**

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 R<sub>f</sub> = 0.22

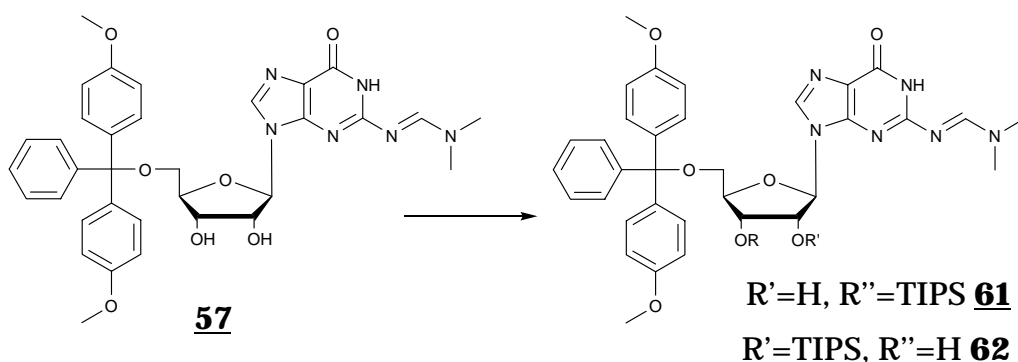
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -0.07, -0.04 (2s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.00, 0.05 (2s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.81 (s, 9H, Si-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.82 (s, 9H, Si-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.06 (2s, 6H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.23-3.30 (m, 1H, 5'-H), 3.60 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.02-4.07 (m, 1H, 4'-H), 4.24-4.28 (m, 1H, 3'-H), 4.65-4.69 (m, 1H, 2'-H), 5.89 (d, J=5.0, 1H, 1'-H), 6.88 (m, 4H, *o*-Methoxy-Phenyl-H), 7.25-7.43 (m, 9H, Phenyl-H), 8.04 (s, 1H, 8-H), 8.45 (s, 1H, Methyliden-H), 11.44 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3409w, 3123w, 3060w, 2953s, 2929s, 2856m, 1704s, 1633s, 1538s, 1463w, 1422w, 1348s, 1303w, 1252s, 1175m, 1114m, 1070w, 1034w, 992w, 939w, 865w, 836s, 780s, 702m, 671w, 583m

**EA:** C<sub>46</sub>H<sub>64</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub> Mr = 861.21  
ber.: C 63.56 H. 7.42 N 9.67  
gef.: C 62.12 H 7.63 N 8.74

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>46</sub>H<sub>64</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub>: 868.4  
gef.: 869.8

**7.2.3.4 Silylierung von 2-N-Dimethylformamidino-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-guanosin 57 mit TIPS-Cl**



Man löste 16.02 g der geschützten Verbindung 57 (25 mmol) in 100 ml warmem abs. Pyridin, fügte anschließend 100 ml abs. DMF und 6.8 g (100 mmol, 4.0 eq)

Imidazol zu und ließ auf RT abkühlen. Unter Argon tropfte man 10.6 ml (9.64 g, 50 mmol, 2.0 eq.) TIPS-Cl zu und rührte über Nacht. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit 400 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 100 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol koevaporiert. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch präparative HPLC (MeOAc/Dioxan = 10:4, Waters PrepPak 500 Silica; refraktometrisch) aufgereinigt wurde. Es konnten von 2'-O-TIPS-Regioisomers **61** 8.37 g (10.5 mmol, 42 %) und von 3'-O-TIPS-Regioisomers **62** 5.78 g (7.25 mmol, 29 %) in Form eines farblosen Schaums isoliert werden.

**2-N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl-guanosin **61****

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/n-Hexan = 8:2 + 5% NEt<sub>3</sub>      R<sub>f</sub> = 0.42

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 0.88-1.04 (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 3.03 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.04 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.24 (m, 2H, 5'-H), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.07 (m, 1H, 4'-H), 4.22 (m, 1H, 3'-H), 4.78 (t, 1H, J=5.0 Hz, 2'-H), 5.15 (t, 1H, J=6.1 Hz, 3'-OH), 5.75 (s, 0.1 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 5.92 (d, 1H, J=4.8 Hz, 1'-H), 6.85 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.18-7.39 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.95 (s, 1H, 8-H), 8.42 (s, 1H, NCHN), 11.34 (s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3258w, 3352w, 3120w, 3058w, 2942s, 2865m, 2552w, 2045w, 1898w, 1689s, 1631s, 1537s, 1463w, 1422m, 1348m, 1303w, 1250m, 1176w, 1150w, 1114w, 1064w, 1034w, 991w, 915w, 882m, 829s, 784m, 726w, 701m, 662w, 583m, 555w

**EA:** C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si      Mr = 797.03

ber.:                      C 64.80      H 7.08      N 10.54

ber. x 0.1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:    C 64.26      H 7.03      N 10.43

gef.:                      C 64.21      H 7.24      N 10.38

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si:      796.4

gef.:                      797.8

**2-N-Dimethylformamidin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyl-guanosin 62**

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexan = 8:2 + 5% NEt<sub>3</sub> R<sub>f</sub> = 0.32

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 0.91-1.09 (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 3.03 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.06 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.17 (m, 2H, 5'-H), 3.74 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.02 (m, 1H, 4'-H), 4.38 (t, 1H, J=4.6 Hz, 3'-H), 4.61 (t, 1H, J=5.0 Hz, 2'-H), 5.43 (d, 1H, J=6.4 Hz, 2'-OH), 5.75 (s, 0.15 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 5.88 (d, 1H, J=5.4 Hz, 1'-H), 6.85 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.22-7.40 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.96 (s, 1H, 8-H), 8.42 (s, 1H, NCHN), 11.28 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3354w, 3123w, 3058w, 2942s, 2865m, 2044w, 1897w, 1686s, 1630m, 1608w, 1542s, 1509s, 1464m, 1422w, 1349s, 1303w, 1251s, 1176m, 11541w, 1115w, 1068w, 1034w, 994w, 917w, 883m, 828s, 785w, 755w, 726w, 703w, 685w, 657w, 584m, 557w

**EA:** C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si Mr = 797.03

ber.: C 64.80 H 7.08 N 10.54

ber. x 0.15 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C 64.04 H 7.01 N 10.39

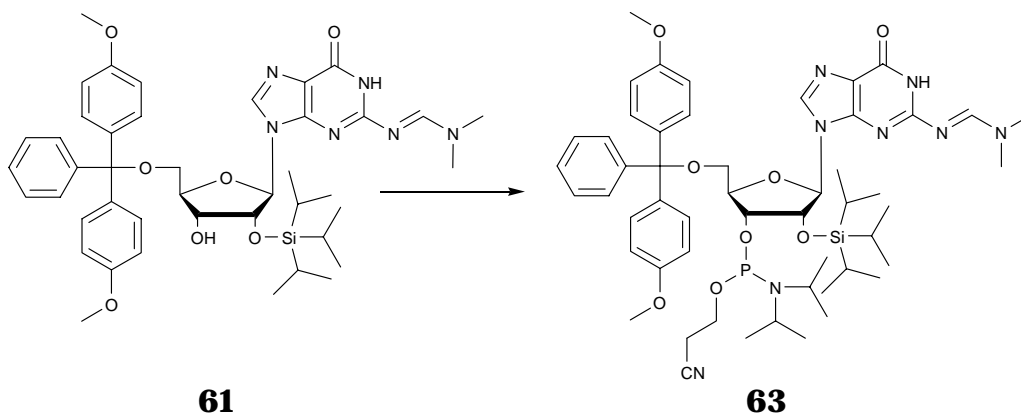
gef.: C 64.15 H 7.10 N 10.15

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>43</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si: 796.4

gef.: 797.8



#### 7.2.3.5 Synthese von 2-N-Dimethylformamidino-3'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl-guanosin 63



3.77 g des mit TIPS geschützten Guanosins **61** (5 mmol) wurden dreimal mit je 5 ml abs. THF koevaporiert und anschließend in 10 ml abs. THF unter Argonatmosphäre bei RT gelöst. Hierzu wurden nacheinander 10.3 ml (7.69 g, 40 mmol, 8.0 eq.) frisch destillierte Hünig-Base und 2.38 g (10 mmol, 2.0 eq.) Diisopropylamino-2-cyanethoxychlor-phosphin gegeben. Nach 24 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 30 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 30 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1:1 + 5 % NEt<sub>3</sub> gereinigt wurde. Es wurden von **63** (2 Diastereomere) 3.99 g (4 mmol, 80%) in Form eines farblosen Schaums erhalten.

**DC:** EtOAc/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1:1 + 5% NEt<sub>3</sub> R<sub>f</sub> = 0.29, 0.38

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 0.81-1.14 (m, 66H, Si-Isopropyl-H, Isopropyl-CH<sub>3</sub>), 2.48 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CN), 2.99 (s, 6H, N-CH<sub>3</sub>), 3.00 (s, 6H, N-CH<sub>3</sub>), 3.24 (m, 4H, Isopropyliden-CH), 3.52–3.64 (m, 4H, 5'-H), 3.71 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (m, 4H, Cyanethoxy-OCH<sub>2</sub>), 4.15-4.42 (m, 4H, 3'-H, 4'-H), 5.09 (t, J=5.0 Hz, 2-H, 2'-H), 5.93 (d, 2H, J=4.8 Hz, 1'-H), 6.84 (dd, 8H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.20-7.35 (m, 18H, *o*-

Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.93, 7.95 (2s, 2H, 8-H), 8.33, 8.36 (2s, 2H, NCHN), 11.39 (s, 2H, NH) (2 Diastereomere)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 149.0, 151.1 im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3409m, 2965s, 2866w, 2724w, 2476w, 2376w, 1687s, 1631s, 1608w, 1538s, 1509s, 1464m, 1424w, 1396w, 1348s, 1303w, 1250s, 1226m, 1178m, 1153w, 1114w, 1063m, 1033m, 981m, 918w, 882m, 829s, 786m, 756w, 727w, 704w, 685w, 657w, 584w

**EA:** C<sub>52</sub>H<sub>73</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>PSi Mr = 997.24

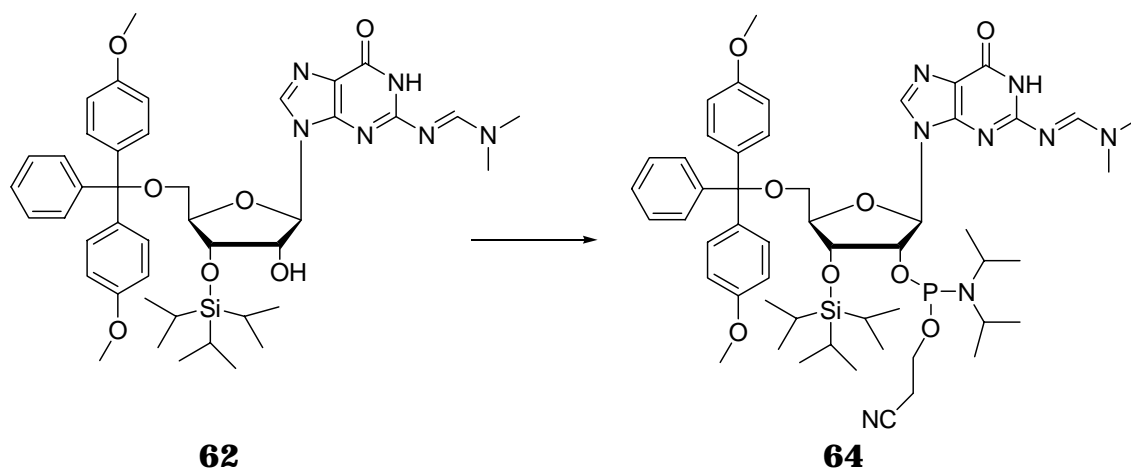
ber.: C 62.63 H 7.38 N 11.24

gef.: C 62.36 H 7.60 N 11.34

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>52</sub>H<sub>73</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>PSi: 997.5

gef.: 997.8

#### 7.2.3.6 Synthese von 2-N-Dimethylformamidino-2'-O-(cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyl-guanosin **64**



3.77 g des mit TIPS geschützten Guanosins **62** (5 mmol) wurden dreimal mit je 5 ml abs. THF koevaporiert und anschließend in 10 ml abs. THF unter einer Argonatmosphäre bei RT gelöst. Hierzu wurden nacheinander 10.3 ml (7.69 g, 40 mmol, 8.0 eq.) frisch destillierte Hünig-Base und 2.38 g (10 mmol, 2.0 eq.) Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorophosphin gegeben. Nach 24 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 30 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt

und dreimal mit je 30 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit  $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1:1 + 5\% \text{NEt}_3$  aufgereinigt wurde. Die Ausbeute von **64** (2 Diastereomere) betrug 3.99 g (4 mmol, 80%) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:**  $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1:1 + 5\% \text{NEt}_3$   $R_f = 0.25, 0.32$

**$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta = 0.90$ -1.20 (m, 66H, Si-Isopropyl-H, Isopropyl- $\text{CH}_3$ ), 2.53 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ -CN), 3.03 (2s, 12H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.24 (m, 4H, Isopropyliden-CH), 3.32–3.54 (m, 6H, 5'-H, Isopropyliden-CH), 3.73 (2s, 12H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.98-4.10 (m, 6H, 4'-H, Cyanethoxy- $\text{OCH}_2$ ), 4.45, 4.52 (2t,  $J=4.0$  Hz, 2H, 3'-H), 4.98, 4.69 (2t,  $J=5.0$  Hz, 2H, 2'-H), 5.76 (s, 0.8 x  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 6.04, 6.10 (2d, 2H,  $J=4.9$  Hz, 1'-H), 6.84 (m, 8H, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.20-7.35 (m, 18H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.88, 7.94 (2s, 2H, 8-H), 8.40 (2s, 2H,  $\text{NCHN}$ ), 11.40 (2s, 2H, N-H) (2 Diastereomere)

**$^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta = 150.1, 151.0$  im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3421m, 2946s, 2867w, 2723w, 2505w, 2366w, 1686s, 1654w, 1630m, 1608m, 1574w, 1541m, 1509s, 1465m, 1446w, 1397w, 1351m, 1301w, 1250s, 1223s, 1176m, 1152w, 1065s, 1032w, 990m, 915w, 883m, 829s, 787w, 755w, 727w, 702w, 684w, 648w, 583

**EA:**  $\text{C}_{52}\text{H}_{73}\text{N}_8\text{O}_8\text{PSi}$   $M_r = 997.24$

ber.: C 62.63 H 7.38 N 11.24

ber. x 0.8  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : C 59.54 H 7.06 N 10.52

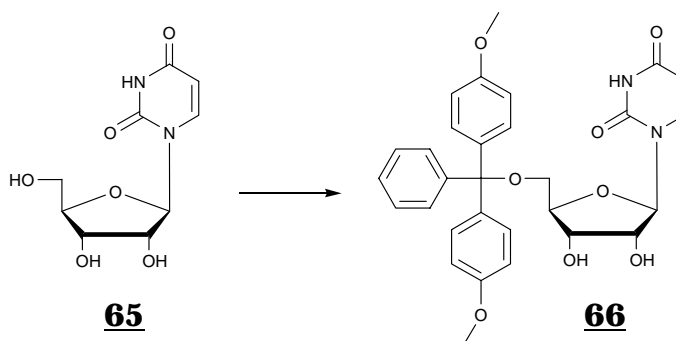
gef.: C 59.60 H 7.73 N 10.82

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für  $\text{C}_{52}\text{H}_{73}\text{N}_8\text{O}_8\text{PSi}$ : 997.5

gef.: 997.8

## 7.2.4 Synthese des Uridin-Phosphoramidits

### 7.2.4.1 Tritylierung zu 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriiphenylmethyl)-uridin **66**



Bei RT wurden unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre zu einer Lösung von 12.21 g Uridin **65** (50 mmol) in 120 ml abs. Pyridin und 120 ml abs. DMSO portionsweise 21.98 g (65 mmol, 1.3 eq.) DMT-Cl gegeben. Man rührte über Nacht, versetzte mit 10 ml MeOH und rührte weitere 10 min. Dann nahm man die Lösung in 1 l EtOAc auf und extrahierte anschließend zehnmal mit je 500 ml ges. aq. NaCl-Lösung. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der gelbe Rückstand wurde dreimal mit Toluol koevaporiert, in 500 ml heißem Toluol gelöst, mit *c*-Hexan versetzt und für mehrere Stunden bei RT stehen gelassen. Die ausgefallenen Kristalle wurden abgesaugt und mit sorgfältig Toluol/cyclo-Hexan = 1:1 gewaschen. Es wurden 25.42 g (46.5 mmol, 93 %) farblose Kristalle des Produkts **66** erhalten.

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.40

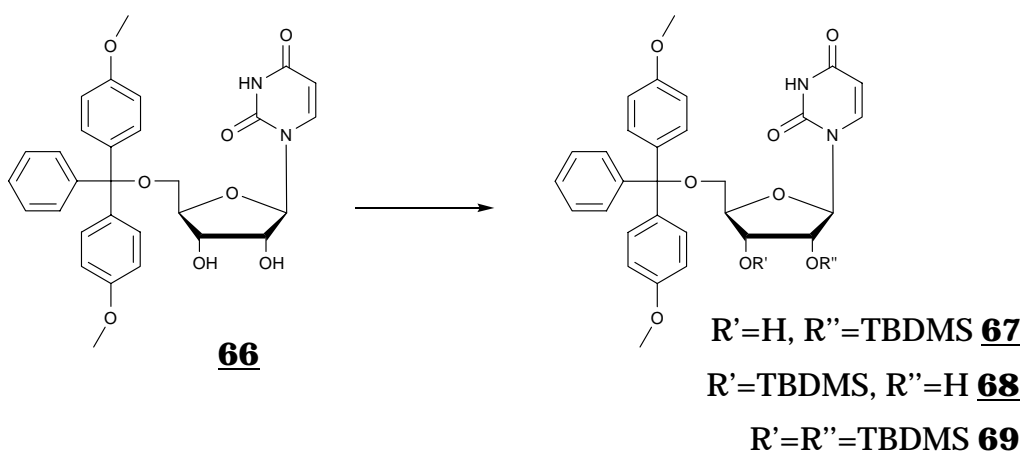
**Schmp.:** 123-124°C (Toluol) Lit. [83]: 123-124°C (Benzol)

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 3.24-3.30 (m, 2H, 5'-H), 3.74 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.96 (m, 1H, 4'-H), 4.08 (m, 2H, 3'-H, 2'-H), 5.15 (d, 1H, J=5.5 Hz, 3'-OH), 5.30 (d, 1H, J=9.1 Hz, 5-H), 5.49 (d, 1H, J=4.8 Hz, 2'-OH), 5.74 (d, 1H, J=3.1 Hz, 1'-H), 6.90 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.23-7.39 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.72 (d, 1H, J=9.1 Hz, 6-H), 11.35 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3396s, 3058m, 2932m, 2835w, 2047w, 1694s, 1607m, 1582w, 1509s, 1463s, 1389m, 1301w, 1252s, 1177m, 1107m, 1033m, 904w, 828s, 758m, 727w, 703m, 584s

**EA:** C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> Mr = 546.57  
 ber.: C 65.92 H 5.53 N 5.13  
 gef.: C 65.70 H 5.58 N 5.03

#### 7.2.4.2 Silylierung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-uridin **66** mit TBDMS-Cl



Zu einer Lösung von 21.85 g des 5'-O-geschützten Uridins **66** (40 mmol) und 10.88 g Imidazol (160 mmol, 4.0 eq.) in 200 ml abs. DMF gab man unter Argon und bei RT 7.23 g (48 mmol, 1.2 eq.) TBDMS-Cl. Nach 12 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 400 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und anschließend dreimal mit je 150 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 150 ml ges. aq. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Einkonzentrieren erhielt man einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 1:2 aufgereinigt wurde. Die Ausbeute an 2'-O-TBDMS-Regioisomer **67** betrug 12.95 g (19.6 mmol, 49 %), an 3'-O-TBDMS-Regioisomer **68** 9.78 g (14.8 mmol, 37 %) und an dem bisilylierten Produkt **69** 1.86 g (2.4 mmol, 6 %) in Form eines farblosen Schaums.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethysilyl-uridin 67****DC:** EtOAc/n-Hexan = 1:1  $R_f$  = 0.53**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = -0.01, 0.00 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.79 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.26 (m, 2H, 5'-H), 3.68 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.95 (m, 1H, 3'-H), 4.00 (m, 1H, 4'-H), 4.14 (m, 1H, 2'-H), 5.07 (d, 1H, J=6.0 Hz, 3'-OH), 5.23 (d, 1H, J=8.1 Hz, 5-H), 5.69 (d, 1H, J=4.0 Hz, 1'-H), 6.84 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.17-7.33 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.68 (d, 1H, J=8.1 Hz, 6-H), 11.31 (br. s, 1H, N-H)**FT-IR (KBr):** 3448m, 3197m, 3061m, 2953s, 2930s, 2856m, 2045w, 1694s, 1582w, 1510s, 1462s, 1380m, 1301w, 1253s, 1177m, 1116m, 1064w, 1035w, 1005w, 914w, 835s, 781m, 726w, 702m, 632w, 584m**EA:** C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Si  $Mr$  = 660.83  
ber.: C 65.43 H 6.71 N 4.24  
gef.: C 65.19 H 6.76 N 4.17**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert*-butyldimethysilyl-uridin 68****DC:** EtOAc/n-Hexan = 1:1  $R_f$  = 0.33**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = -0.06, 0.00 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.75 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.11-3.17, 3.28-3.33 (m, 2H, 5'-H), 3.71 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.89 (m, 1H, 4'-H), 4.07 (m, 1H, 3'-H), 4.13 (m, 1H, 2'-H), 5.33 (d, 1H, J=5.6 Hz, 2'-OH), 5.34 (d, 1H, J=8.1 Hz, 5-H), 5.71 (d, 1H, J=4.0 Hz, 1'-H), 6.87 (dd, 4H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.19-7.36 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.75 (d, 1H, J=8.1 Hz, 6-H), 11.34 (br. s, 1H, N-H)**FT-IR (KBr):** 3448m, 3198m, 3060m, 2953s, 2930s, 2856m, 2046m, 1700s, 1608s, 1509s, 1459s, 1388m, 1301w, 1252m, 1177m, 1116w, 1035w, 1005w, 913w, 835s, 779m, 726w, 702m, 677w, 584m**EA:** C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Si  $Mr$  = 660.83  
ber.: C 65.43 H 6.71 N 4.24  
gef.: C 65.34 H 6.82 N 4.13

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2',3'-di-O-*tert*-butyldimethsilyl-uridin **69****

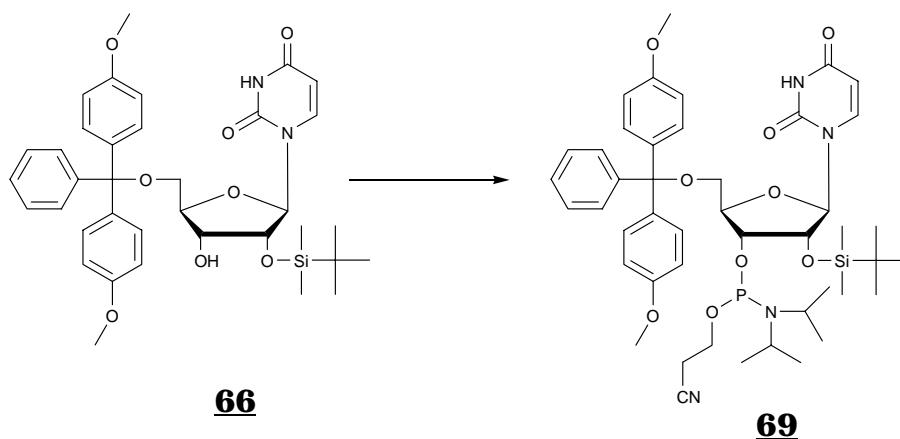
**DC:** EtOAc/n-Hexan = 1:1  $R_f = 0.72$

**$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta = -0.07\text{-}0.00$  (4s, 12H, 4 Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.71 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.81 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.17-3.20, 3.27-3.29 (m, 2H, 5'-H), 3.71 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.93 (m, 1H, 4'-H), 4.04 (m, 1H, 3'-H), 4.24 (m, 1H, 2'-H), 5.32 (d, 1H,  $J=8.1\text{Hz}$ , 5-H), 5.69 (d, 1H,  $J=4.1\text{ Hz}$ , 1'-H), 6.87 (dd, 4H,  $J=9.0\text{ Hz}$ , 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.18-7.35 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.79 (d, 1H,  $J=8.1\text{ Hz}$ , 6-H), 11.36 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3409w, 3196m, 3061m, 2953s, 2857m, 2046w, 1696s, 1608s, 1582w, 1510s, 1463s, 1411w, 1388m, 1301w, 1253s, 1175m, 1129w, 1100w, 1068w, 1036w, 1002m, 939w, 903w, 866w, 836s, 778m, 702m, 673m, 630w, 584m

**EA:** C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub> Mr = 775.09  
 ber.: C 65.08 H 7.54 N 3.61  
 gef.: C 65.25 H 7.64 N 3.42

**7.2.4.3 Synthese von 3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethsilyl-uridin **69****



Eine Mischung von 3.30 g Verbindung **66** (5 mmol) und 60 mg (0.5 mmol, 0.1 eq.) DMAP wurde dreimal mit je 5 ml abs. THF ko-evaporiert und

anschließend in 20 ml abs. THF unter Argonatmosphäre gelöst. Hierzu wurden erst 3.4 ml (20 mmol, 4.0 eq.) frisch destillierte Hünig-Base gegeben und dann 1.41 g (6 mmol, 1.2 eq.) Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorphosphin getropft. Nach 4 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit 150 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und zweimal mit je 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/n-Hexan = 1:1 + 5% NEt<sub>3</sub> aufgereinigt wurde. Die Ausbeute des Uridin-Phosphoramidits **69** (2 Diastereomere) betrug 3.28 g (3.65 mmol, 73 %) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1 + 5 % NEt<sub>3</sub> R<sub>f</sub> = 0.45, 0.51

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 0.04, 0.05 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.07, 0.08 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.84, 0.86 (2s, 18H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.98, 1.11 (2d, 24H, J=6.7 Hz, Isopropyl-CH<sub>3</sub>), 2.57, 2.78 (2t, 4H, J=5.8 Hz, CH<sub>2</sub>-CN), 3.32 (m, 4H, Isopropyliden-CH), 3.55 (m, 4H, 5'-H), 3.74 (2s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (m, 4H, Cyanethoxy-OCH<sub>2</sub>), 4.13-4.20 (m, 4H, 4'-H, 3'-H), 4.39, 4.44 (2t, J=5.0 Hz, 2H, 2'-H), 5.36, 5.38 (2d, 2H, J=8.0 Hz, 5-H), 5.78, 5.82 (2d, 2H, J=4.0 Hz, 1'-H), 6.88, 6.91 (2dd, 8H, J=9.0 Hz, 2.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.19-7.42 (m, 18H, *o*-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.70, 7.74 (2d, 2H, J=8.0 Hz, 6-H), 11.38 (br. s, 2H, N-H) (2 Diastereomere)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** 149.8, 150.3 im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3198m, 3061w, 2965s, 2931s, 2858w, 1697s, 1608s, 1582w, 1560w, 1509s, 1460s, 1379m, 1301m, 1253s, 1179m, 1155w, 1126w, 1087w, 1036m, 1004w, 980w, 938w, 901w, 878w, 833m, 812w, 779w, 726w, 703w, 638w, 584m

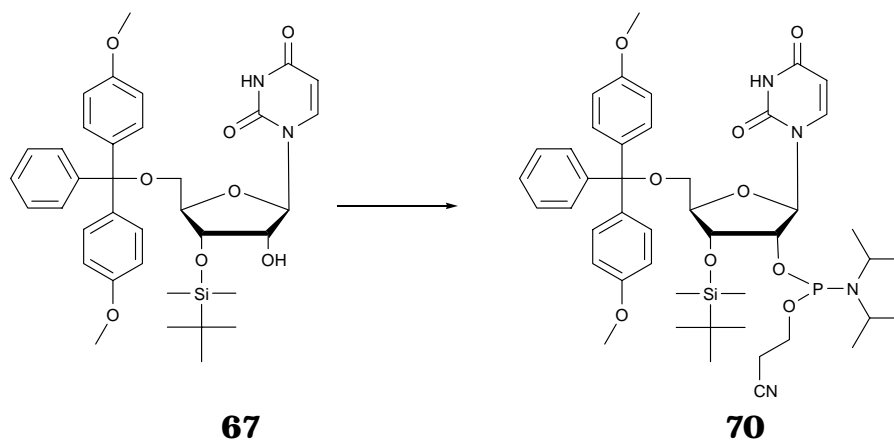
**EA:** C<sub>45</sub>H<sub>61</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>PSi Mr = 861.05

ber.: C 62.77 H 7.14 N 6.51

gef.: C 62.60 H 7.15 N 6.58



#### 7.2.4.4 Darstellung von 2'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-uridin **70**



Eine Mischung von 3.30 g Verbindung **67** (5 mmol) und 60 mg (0.5 mmol, 0.1 eq.) DMAP wurde dreimal mit je 5 ml abs. THF koevaporiert und anschließend in 20 ml abs. THF unter einer Argonatmosphäre gelöst. Hierzu wurde erst 3.4 ml (16 mmol, 4.0 eq.) frisch destillierte Hünig-Base gegeben und 1.41 g (6 mmol, 1.2 eq.) Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorphosphin getropft. Nach 4 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit 150 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und zweimal mit je 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/n-Hexan = 1:1 + 5% NEt<sub>3</sub> aufgereinigt wurde. Die Ausbeute an **70** (2 Diastereomere) betrug 3.77 g (4.3 mmol, 86 %) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1 + 3% NEt<sub>3</sub>  $R_f$  = 0.43, 0.50

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 0.04, -0.02 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.02, 0.08 (2s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.76, 0.78 (2s, 18H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.08, 1.14 (2d, 24H, J=6.7 Hz, Isopropyl-CH<sub>3</sub>), 2.70, 2.73 (2t, 4H, J=5.8 Hz, CH<sub>2</sub>-CN), 3.32 (m, 4H, Isopropyliden-CH), 3.59 (m, 4H, 5'-H), 3.74 (2s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.80 (m, 4H, Cyanethoxy-OCH<sub>2</sub>), 3.93-4.31 (m, 4H, 4'-H, 3'-H), 4.21-4.47

(m, 2H, 2'-H), 5.38, 5.44 (2d, 2H, J=8.0 Hz, 5-H), 5.87, 5.93 (2d, 2H, J=4.0 Hz, 1'-H), 6.88-6.92 (m, 8H, m-Methoxyphenyl-H), 7.23-7.38 (m, 18H, o-Methoxyphenyl-H, Phenyl-H), 7.74, 7.83 (2d, 2H, J=8.0 Hz, 6-H), 11.35 (br. s, 2H, N-H) (2 Diastereomere)

**$^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta$  = 150.6, 150.5 im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3412w, 3199m, 3061w, 2963s, 2931s, 2857w, 1696s, 1608m, 1582w, 1560w, 1509s, 1460s, 1202w, 1178m, 1153w, 1111w, 1069w, 1036m, 980m, 899w, 864w, 834s, 779m, 726w, 703w, 671w, 640w, 583m

**EA:**  $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_9\text{PSi}$  Mr = 877.09

ber.: C 62.99 H 7.47 N 6.39

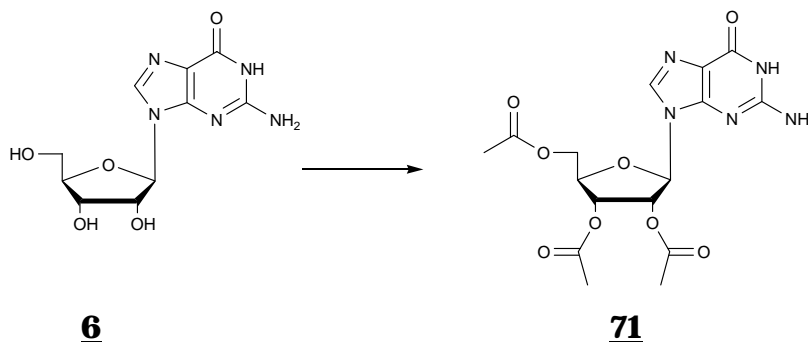
gef.: C 62.90 H 7.17 N 6.51

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für  $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_9\text{PSi}$ : 861.1

gef.: 861.8

## 7.2.5 Synthese des Diaminopurinphosphoramidits

### 7.2.5.1 Darstellung von 2',3',5'-Tri-O-Acetyl-guanosin 71



In einer Mischung aus 40 ml abs. DMF, 15 ml abs. Pyridin und 30 ml Essigsäureanhydrid (317.6 mmol, 6.4 eq.) suspendierte man unter einer Argonatmosphäre 14.2 g Guanosin 6 (50 mmol). Nach einer halben Stunde bei 75°C bildete sich eine klare Lösung, die für weitere 4 h gerührt wurde. Anschließend engte man die Lösung im Vakuum so weit ein, bis sie sich eintrübte. Das Gemisch wurde mit 50 ml i-PrOH versetzt und auf 4°C gekühlt.

Der Feststoff wurde abgesaugt, mit i-PrOH gewaschen und aus i-PrOH umkristallisiert. Man erhielt 16.51 g an farblosen Kristallen der Verbindung **71** (40.3 mmol, 81%).

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.20

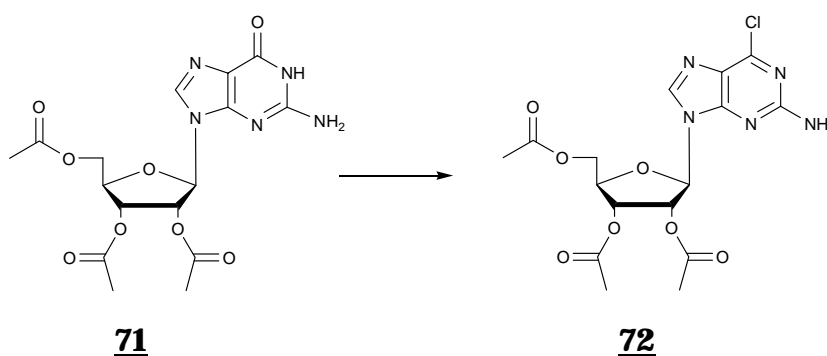
**Schmp.:** 229-230°C (i-PrOH)      **Lit.:** 230-233°C (i-PrOH)

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.22-4.40 (m, 3H, 4'-H, 5'-H), 5.49 (m, 1H, 3'-H), 5.79 (t, J=6.1 Hz, 1H, 2'-H), 5.98 (d, J=6.1 Hz, 1H, 1'-H), 6.52 (br. s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.92 (s, 1H, 8-H), 10.72 (s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3464m, 3312m, 3196s, 3033w, 2936m, 2852w, 2734m, 2288w, 1747s, 1700s, 1633s, 1597m, 1538m, 1485s, 1418m, 1373s, 1227s, 1171m, 1092w, 1050m, 10189w, 958w, 910m, 859w, 809w, 783m, 736w, 678m, 638w, 603w

<b>EA:</b>	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	Mr = 409.35	
ber.:	C 46.95	H 4.68	N 17.11
gef.:	C 47.01	H 4.92	N 17.12

#### 7.2.5.2 Synthese von 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-amino-6-chloropurin 72



In 50 ml trockenem MeCN suspendierte man unter Argon 14.33 g Tri-O-Ac-Guanosin **71** (35 mmol), 11.60 g im Ölpumpenvakuum bei 80°C getrocknetes Et<sub>4</sub>NCl (70 mmol, 2 eq.), 4.5 ml frisch destilliertes N,N-Dimethylanilin (4.24 g, 35 mmol, 1 eq.) und 11.0 ml POCl<sub>3</sub> (16.10 g, 105 mmol, 3 eq.). Es wurde für

10 min. auf 100°C erhitzt, wobei die Lösung aufklarte und sich dunkel färbte. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 200 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen, mit 250 ml Eiswasser versetzt und für 15 min. heftig gerührt. Nach der Phasentrennung extrahierte man die wässrige Phase dreimal mit je 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und wusch die vereinigten organischen Phasen fünfmal mit je 100 ml ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung säurefrei. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, im Vakuum bis auf etwa 100 ml eingeengt und zur Kristallisation mit 200 ml i-PrOH versetzt. Über Nacht fielen bei 4°C 11.08 g an leicht gelblichen Kristallen von **72** aus (25.9 mmol, 74%).

**Schmp.:** 152-153°C (i-PrOH) Lit. [83]: 152-153°C (i-PrOH)

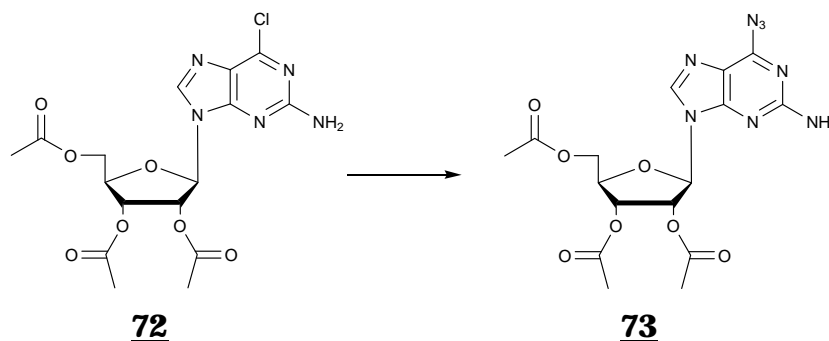
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1 R<sub>f</sub> = 0.45

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.03 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.26–4.43 (m, 3H, 4'-H, 5'-H), 5.53 (t, J=3.7 Hz, 1H, 3'-H), 5.87 (t, J=5.8 Hz, 1H, 2'-H), 6.10 (d, J=6.1 Hz, 1H, 1'-H), 7.06 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.36 (s, 1H, 8-H)

**FT-IR (KBr):** 3442s, 3313s, 3209s, 3122w, 2982w, 2923w, 2711w, 2367w, 1732s, 1635s, 1613s, 1557s, 15241m, 1484s, 1454w, 1410m, 1377m, 1323m, 1249s, 1215s, 1144m, 1103w, 1047m, 997w, 939w, 907s, 858m, 805s, 784s, 731m, 729m, 643m, 596m, 572w

**EA:** C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>7</sub> Mr = 427.80  
ber.: C 44.02 H 4.24 N 16.37  
gef.: C 44.03 H 4.43 N 16.34

### 7.2.5.3 Darstellung von 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-amino-6-azidopurin **73**



In einem Braunglaskolben vereinigte man unter einer Argonatmosphäre 10.7 g Chloro-Purin **72** (25 mmol), 10.7 ml N-Methyl-pyrrolidin (8.52 g 100 mmol, 4 eq.) und 3.25 g Natriumazid (50 mmol, 2 eq.) in 150 ml abs. DMF und rührte 12 h bei RT. Dann versetzte man mit 300 ml Wasser und 150 ml gesättigter aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und extrahierte fünfmal mit je 150 ml EtOAc. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 150 ml Wasser gewaschen und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 8.80 g von **73** in Form eines leicht rosa Schaums (20.25 mmol, 81 %).

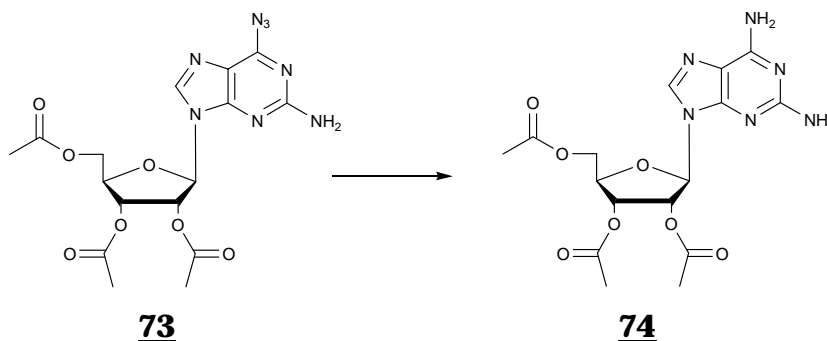
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.25

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.26-4.46 (m, 3H, 5'-H, 4'-H), 5.56 (q, J=5.9 Hz, 6.2 Hz, 1H, 3'-H), 5.89 (t, J=5.7 Hz, 1H, 2'-H), 6.22 (d, J=6.0 Hz, 1H, 1'-H), 8.41 (s, 1H, 8-H), 8.55 (s, 2H, NH<sub>2</sub>)

**FT-IR (KBr):** 3338m, 3205w, 3151w, 2368w, 2127w, 1750s, 1700w, 1664s, 1618m, 1559s, 1492m, 1436w, 1369m, 1231s, 1163w, 978w, 907w, 860w, 794w, 770w, 676w, 639w, 604w

**EA:** C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub>      Mr = 434.36  
ber.: C 44.24      H 4.18      N 25.80  
gef.: C 43.97      H 4.43      N 25.58

#### 7.2.5.4 Hydrierung des Azids 73 zu 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin 74



In 250 ml Dioxan suspendierte man 8.68 g des Azids 73 (20 mmol) und 2.4 g Pd/C. Nachdem mit Argon gespült wurde, gab man einen leichten Überdruck H<sub>2</sub> mittels eines Ballons auf den Kolben und ließ 16 h bei RT rühren. Nach Abfiltrieren über Celite engte man im Vakuum bis zur Trockene ein. Man erhielt 8.32 g der Verbindung 74 in Form eines farblosen Schaums (19.6 mmol, 98 %).

**Schmp.:** 105-106°C (Dioxan) Lit. [83]: 105-106°C

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1 R<sub>f</sub> = 0.25

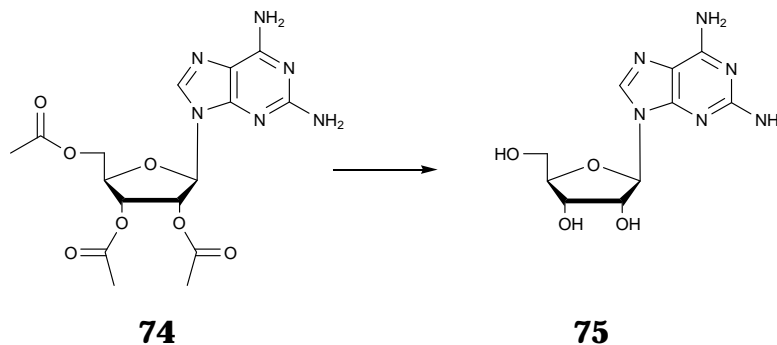
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 2.04 (2s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.23–4.43 (m, 3H, 5'-H, 4'-H), 5.56 (q, J=5.8 Hz, 5.8 Hz, 1H, 3'-H), 5.85–5.90 (m, 3H, NH<sub>2</sub>, 2'-H), 6.83 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.95 (s, 1H, 8-H)

**FT-IR (KBr):** 3468m, 3344s, 3197s, 2961m, 2857w, 2422w, 2126w, 1752s, 1603s, 1509w, 1475m, 1410s, 1374m, 1341w, 1220s, 1119w, 1096w, 1045w, 906w, 890w, 872m, 791s, 144w, 639w, 614w

**EA:** C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> Mr = 408.37

ber.: C 47.06 H 4.94 N 20.58

gef.: C 46.81 H 4.99 N 20.65

7.2.5.5 Synthese von 9-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin **75**

Man löste 2.04 g des Tri-O-Ac-Diaminopurins **74** (5 mmol) in 20 ml MeOH und kühlte auf 0°C ab. Dazu wurden 3.7 ml einer 5.4 M Lösung von NaOMe (20 mmol, 4 eq.) in MeOH getropft. Nach 15 min. wurde mit 1 M aq. HCl neutralisiert, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Die Lösung wurde etwas im Vakuum eingeeengt, der Feststoff abfiltriert und aus MeOH umkristallisiert. Man erhielt 1.34 g (4.75 mmol, 95 %) der Verbindung **75** in Form eines farblosen Pulvers.

**Schmp.:** 242-244°C (MeOH) Lit. [83]: 242-244°C

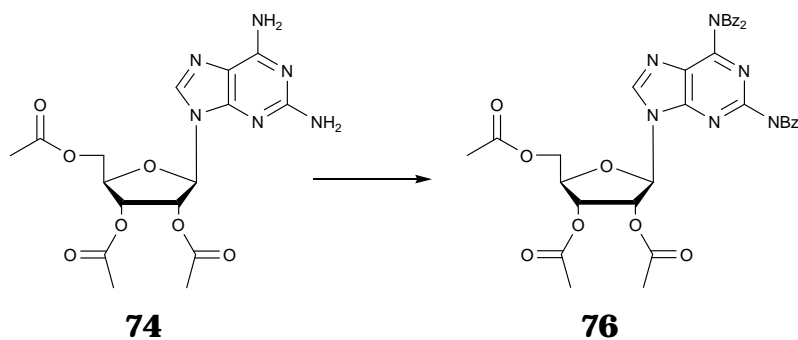
**DC:** EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc = 16:4:4:1  $R_f$  = 0.49

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 3.48-3.66 (m, 2H, 5'-H), 3.90 (m, 1H, 4'-H), 4.09 (m, 1H, 3'-H), 4.50 (m, 1H, 2'-H), 5.07 (d, J=4.7 Hz, 1H, 3'-OH), 5.34 (m, 2H, 2'-OH, 5'-OH), 5.72 (d, J=4.2 Hz, 1H, 1'-H), 5.78 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.79 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.90 (s, 1H, 8H)

**FT-IR (KBr):** 3328s, 3196s, 2942w, 2345w, 1703m, 1652s, 1593s, 1528w, 1510w, 1480s, 1412s, 1342w, 1273w, 1222m, 1193w, 1124w, 1087w, 1053w, 1022w, 984w, 901m, 860m, 790w, 770w, 702w, 670w, 631m

**EA:** C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> Mr = 282.26  
ber.: C 42.55 H 5.00 N 29.77  
gef.: C 42.28 H 5.02 N 29.63

### 7.2.5.6 Benzoylierung zu 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,2-N,6-N,6-N-tetrabenzoyl-2,6-diaminopurin 76



Ein Lösung 6.18 g (15 mmol) des geschützten Diaminopurins 74 und 100 mg (0.82 mmol, 0.05 eq.) DMAP in 75 ml abs. Pyridin wurde auf 0°C abgekühlt. Dazu wurden unter Argon während 30 min. 10.5 ml (12.65 g, 90 mmol, 6 eq.) Benzoessäurechlorid getropft. Die Kühlung wurde entfernt und die Reaktionsmischung für weitere 2 h gerührt. Anschließend gab man vorsichtig 150 ml ges. aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zu und rührte weitere 5 min. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 80 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Es ergab sich ein gelber Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 2:1 aufgereinigt wurde. Es wurden 6.56 g (7.95 mmol, 53 %) von 76 in Form eines farblosen Schaums isoliert.

**DC:** EtOAc/Hexan = 2:1  $R_f$  = 0.33

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.21-4.37 (m, 3H, 4'-H, 5'-H), 5.39 (dd, 1H, J=6.0 Hz, 4.0 Hz, 3'-H), 5.46 (t, 1H, J=6.0 Hz, 2'-H), 6.08 (d, 1H, J=4.6 Hz, 1'-H), 7.39-7.96 (m, 20H, Bz-H), 8.71 (s, 1H, 8-H)

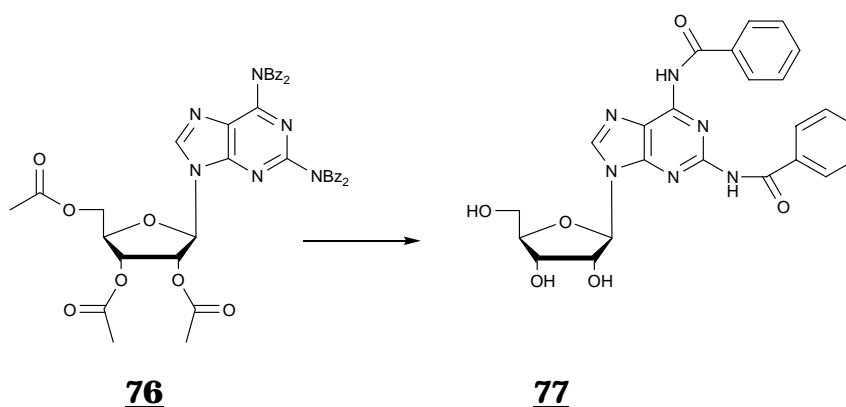
**FT-IR (KBr):** 3198w, 3063m, 2936w, 2625w, 2345w, 1968w, 1910w, 1751s, 1706s, 1600s, 1582s, 1508m, 1450m, 1405w, 1373m, 1240s, 1177w, 1098m, 1071w, 1048w, 1026w, 1002w, 978w, 900m, 830w, 793m, 713s, 644w, 603w, 563w

**EA:** C<sub>44</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>  $Mr$  = 824.79



ber.:	C 64.07	H 4.40	N 10.19
ber. x 0.5 H <sub>2</sub> O:	C 63.38	H 4.47	N 10.08
gef.:	C 63.24	H 4.70	N 10.21
<b>ESI<sup>+</sup>-MS:</b> ber. für C <sub>44</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> :	824.2		
gef.:	825.5		

#### 7.2.5.7 Partielle Entschützung zu 9-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)-2N,6N-2,6-dibenzoyl-diaminopurin 77



Eine stark gerührte Lösung von 5.77 g (7 mmol) des benzylierten Edukts 76 in 50 ml abs. MeOH, die auf 0°C abgekühlt wurde, versetzte man mit 7.8 ml einer 5.4 M Lösung von NaOMe in MeOH (42 mmol, 6 eq.). Nach 15 min. wurde mit DOWEX-Ionenaustauscher 50X8 H<sup>+</sup>-Form neutralisiert. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag. Mit einer groben Fritte entfernte man den Ionenaustauscher. Anschließend wurde das Produkt abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Man erhielt 3.26 g der Verbindung 77 (6.65 mmol, 95 %) in Form farbloser Kristalle.

**Schmp.:** 247-249°C

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1  $R_f$  = 0.45

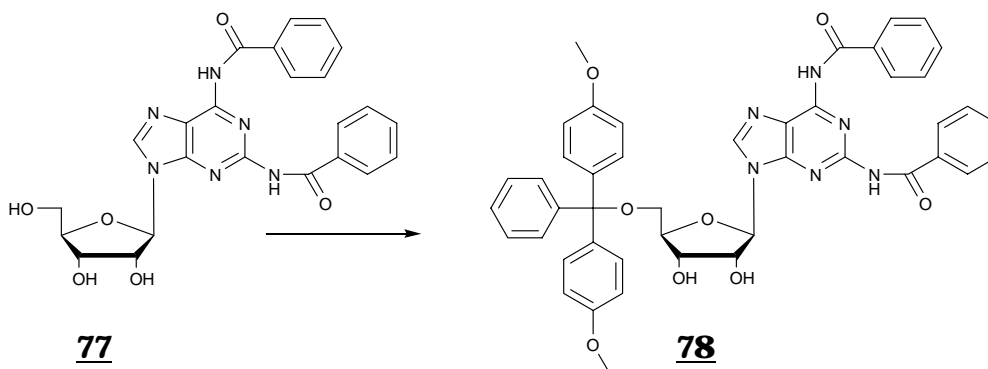
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 3.59-3.65 (m, 2H, 5'-H), 3.96 (m, 1H, 4'-H), 4.19 (m, 1H, 3'-H), 4.68 (m, 1H, 2'-H), 5.02 (m, 1H, 5'-OH), 5.23 (d, 1H, J=4.7 Hz, 3'-OH), 5.56 (d, 1H, J=5.9 Hz, 2'-OH), 6.00 (d, 1H, J=6.0 Hz, 1'-H), 7.52-7.65 (m, 6H, *m*-Bz-H, *p*-Bz-H), 8.00 (d, 2H, J=7.0 Hz, *o*-

Bz-H), 8.08 (d, 2H,  $J=7.0$  Hz, *o*-Bz-H), 8.64 (s, 1H, 8-H), 11.03 (br. s, 1H, N-H), 11.23 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3500m, 3394m, 3315w, 3219w, 3118w, 2936w, 1829w, 1762w, 1630s, 1608s, 1534m, 1490s, 1450m, 1402w, 1360m, 1317m, 1272w, 1252m, 1192m, 1136s, 1093w, 1050m, 1017m, 997w, 910m, 854m, 786m, 744m, 701m, 634m, 616w, 581w

**EA:** C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> Mr = 490.47  
ber.: C 58.77 H 4.52 N 17.13  
gef.: C 58.60 H 4.71 N 17.24

#### 7.2.5.8 Tritylierung zu 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2N,6N-dibenzoyl-2,6-diaminopurin **78**



Zu einer Lösung von 2.94 g des benzoylierten Diaminopurins **77** (6 mmol) in 25 ml abs. Pyridin wurden unter Argonatmosphäre bei RT 2.64 g (7.8 mmol, 1.3 eq.) DMT-Cl und 50 mg (0.42 mmol, 0.07 eq.) DMAP gegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch mit 5 ml MeOH versetzt und für weitere 10 min. gerührt. Man entfernte das Lösungsmittel im Vakuum, koevaporierte den Rückstand dreimal mit Toluol und löste den Rückstand in 80 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Die organische Phase wurde zweimal mit je 30 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, schließlich über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der gelbliche Schaum wurde durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/*n*-Hexan = 2:1 aufgereinigt. Die Ausbeute an **78** betrug 3.95 g (4.98 mmol, 83 %) eines farblosen Schaums.

**DC:** EtOAc/Hexan = 2:1  $R_f$  = 0.26

**$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta$  = 3.16-3.20, 3.35-3.48 (m, 2H, 5'-H), 3.33 (s, 0.6 x  $\text{H}_2\text{O}$ ), 3.69 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.07 (m, 1H, 4'-H), 4.35 (m, 1H, 3'-H), 4.77 (m, 1H, 2'-H), 5.20 (d, 1H,  $J=5.7$  Hz, 3'-OH), 5.65 (d, 1H,  $J=5.6$  Hz, 2'-OH), 6.04 (d, 1H,  $J=4.8$  Hz, 1'-H), 6.75 (t, 4H,  $J=9.0$  Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.16-7.32 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.49-7.65 (m, 6H, *m*-Bz-H, *p*-Bz-H), 7.93 (d, 2H,  $J=7.0$  Hz, *o*-Bz-H), 8.08 (d, 2H,  $J=7.0$  Hz, *o*-Bz-H), 8.52 (s, 1H, 8-H), 10.91 (br. s, 1H, N-H), 11.20 (br. s, 1H, N-H)

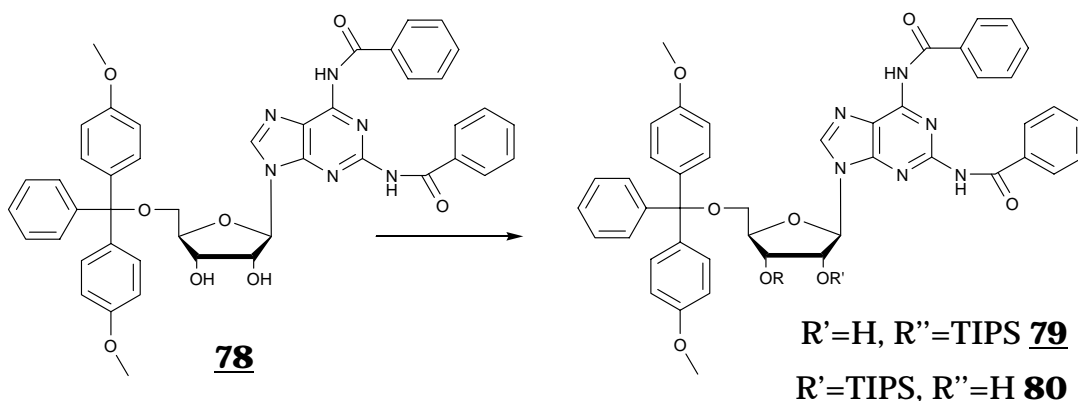
**FT-IR (KBr):** 3349s, 3060w, 2931m, 2835w, 2048w, 1969w, 1910w, 1812w, 1699s, 1597s, 1543w, 1509w, 1440w, 1407w, 1302m, 1248m, 1177m, 1086w, 1031w, 934w, 901w, 884w, 828m, 793m, 753m, 705s, 634w, 584w

**EA:**  $\text{C}_{45}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_8$   $\text{Mr} = 792.83$

ber.:	C 68.17	H 5.09	N 10.60
ber. x 0.6 $\text{H}_2\text{O}$ :	C 67.25	H 5.17	N 10.46
gef.:	C 67.18	H 5.25	N 10.32

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für  $\text{C}_{45}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_8$ : 792.3  
gef.: 793.6

#### 7.2.5.9 Silylierung von 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2N,6N-dibenzoyl-2,6-diaminopurin **78** mit TIPS-Cl



Zu einer Lösung von 3.57 g des Diaminopurinderivats **78** (4.5 mmol) und 1.23 g (18 mmol, 4.0 eq.) Imidazol in 40 ml abs. DMF wurden bei RT und unter

Argonatmosphäre 1.9 ml (1.74 g, 9 mmol, 2 eq.) TIPS-Cl gegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch mit 150 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 50 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 1:1 aufgereinigt wurde. Die Ausbeute an 2'-O-TIPS-Regioisomer **79** betrug 1.93 g (2.03 mmol, 45 %) und an 3'-O-TIPS-Regioisomer **80** betrug 1.5 g (1.58 mmol, 35 %) in Form eines farblosen Schaums.

**9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl-β-D-ribofuranosyl)-2N,6N-dibenzoyl-2,6-diaminopurin 79**

**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1  $R_f = 0.41$

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 0.81-1.07 (m, 21 H, Si-Isopropyl-H), 3.24-3.30, 3.39-3.46 (m, 2H, 5'-H), 3.70 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.12 (m, 1H, 4'-H), 4.32 (m, 1H, 3'-H), 5.08 (d, 1H, J=5.8 Hz, 3'-OH), 5.11 (m, 1H, 2'-H), 6.09 (d, 1H, J=3.1 Hz, 1'-H), 6.76 (t, 4H, J=9.0 Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.15-7.40 (m, 9H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.49-7.69 (m, 6H, *m*-Bz-H, *p*-Bz-H), 7.90 (d, 2H, J=7.0 Hz, *o*-Bz-H), 8.08 (d, 2H, J=7.0 Hz, *o*-Bz-H), 8.55 (s, 1H, 8-H), 10.77 (s, 1H, N-H), 11.17 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3408s, 3061w, 1943s, 2866m, 2368w, 1774w, 1702s, 1624m, 1594s, 1509s, 1465w, 1440m, 1405w, 1380w, 1300w, 1251s, 1177m, 1119w, 1073w, 1034w, 1013w, 915w, 883m, 830s, 795m, 754w, 705s, 596w, 584w

**EA:** C<sub>54</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Si  $Mr = 949.18$   
ber.: C 68.33 H 6.37 N 8.85  
gef.: C 68.08 H 6.38 N 8.59

**9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyl-β-D-ribofuranosyl)-2N,6N-dibenzoyl-2,6-diaminopurin 80**

**DC:** EtOAc/Hexan = 1:1  $R_f = 0.26$

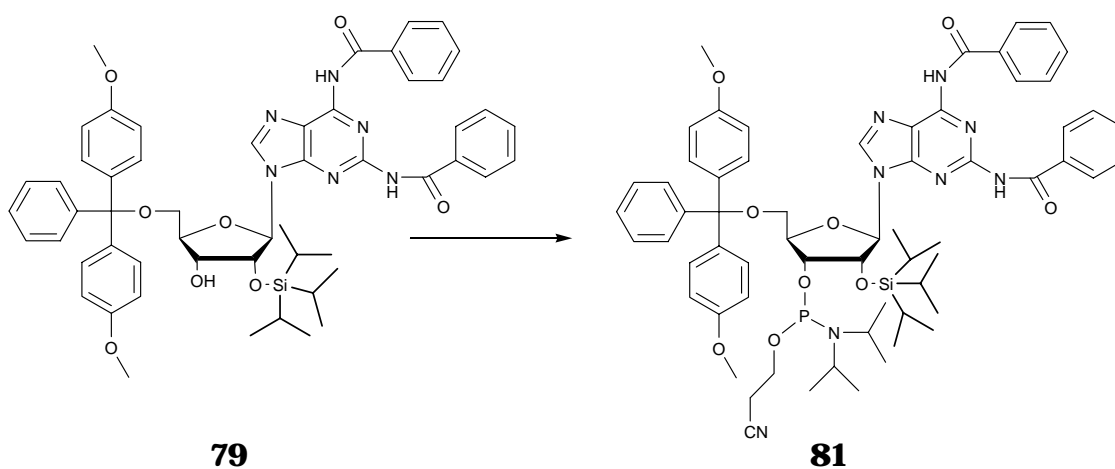
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 0.94-1.06 (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 3.37 (m, 2H, 5'-H), 3.70 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.05 (m, 1H, 4'-H), 4.57 (m, 1H, 3'-H), 4.94 (m, 1H, 2'-H), 5.46 (d, 1H, J=6.2 Hz, 2'-OH), 6.02 (d, 1H,

$J=5.3$  Hz, 1'-H), 6.76 (t, 4H,  $J=9.0$  Hz, m-Methoxyphenyl-H), 7.15-7.38 (m, 9H, Phenyl-H, o-Methoxyphenyl-H), 7.48-7.68 (m, 6H, m-Bz-H, p-Bz-H), 7.96 (d, 2H,  $J=7.0$  Hz, o-Bz-H), 8.08 (d, 2H,  $J=7.0$  Hz, o-Bz-H), 8.56 (s, 1H, 8-H), 10.88 (br. s, 1H, N-H), 11.20 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3408s, 3061w, 2942s, 2865m, 2553w, 2045w, 1968w, 1910s, 1700s, 1624m, 1595s, 1509m, 1465m, 1441s, 1406m, 1380w, 1301m, 1252s, 1177m, 1148w, 1072m, 1034m, 1013w, 922w, 883s, 828s, 793m, 754w, 705s, 644w, 584m

**EA:**  $C_{54}H_{60}N_6O_8Si$   $Mr = 949.18$   
 ber.: C 68.33 H 6.37 N 8.85  
 gef.: C 68.17 H 6.41 N 8.68

**7.2.5.10 Synthese des 9-(3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2N,6N-dibenzoyl-2,6-diaminopurin 81**



Eine Mischung von 1.42 g Verbindung 79 (1.5 mmol) und 17 mg (0.15 mmol, 0.1 eq.) DMAP wurde dreimal mit je 5 ml abs. THF koevaporiert und anschließend in 10 ml abs. THF unter einer Argonatmosphäre bei RT gelöst. Dazu wurden nacheinander 1.0 ml (0.78 g, 6 mmol, 4.0 eq.) frisch destillierte Hünig-Basis und 0.46 g Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorphosphin (1.95 mmol, 1.3 eq.) gegeben. Nach 4 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 20 ml 5 %iger aq.  $NaHCO_3$ -Lösung versetzt und dreimal mit je 20 ml EtOAc

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit  $\text{EtOAc/n-Hexan} = 1:1 + 5\% \text{ NEt}_3$  aufgereinigt wurde. Die Ausbeute des Phosphoramidits **81** (2 Diastereomere) betrug 1.38 g (1.2 mmol, 80 %) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:**  $\text{EtOAc/Hexan} = 1:1 + 5\% \text{ NEt}_3$   $R_f = 0.45, 0.53$

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta = 0.75\text{--}1.00$  (m, 42H, Si-Isopropyl-H), 1.04, 1.14 (2d,  $J=6.6$  Hz, 24H, Isopropyl- $\text{CH}_3$ ), 3.30-3.66 (m, 12H,  $\text{CH}_2\text{-CN}$ , Isopropyliden-CH, 5'-H), 3.67 (s, 12H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.82 (m, 4H, Cyanethoxy- $\text{OCH}_2$ ), 4.17-4.43 (m, 4H, 4'-H, 3'-H), 5.51, 5.57 (2t, 2H,  $J=4.5$  Hz, 2'-H), 6.02, 6.05 (2d, 2H,  $J=6.8$  Hz, 1'-H), 6.69, 6.72 (2t, 8H,  $J=9.1$  Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.11-7.42 (m, 18H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 7.45-7.69 (m, 12H, *m*-Bz-H, *p*-Bz-H), 7.81, 7.84 (2d, 4H,  $J=7.2$  Hz, *o*-Bz-H), 8.09 (d, 4H,  $J=7.2$  Hz, *o*-Bz-H), 8.58, 8.59 (2s, 2H, 8-H), 10.64, 10.70 (2s, 2H, N-H), 11.19, 11.20 (2s, 2H, N-H) (2 Diastereomere)

**$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta = 149.3, 151.6$  im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3411m, 3064w, 2965s, 2867m, 1702s, 1595s, 1509s, 1466m, 1441m, 1405w, 1381w, 1300m, 1252s, 1179m, 1157w, 1124w, 1074w, 1034m, 1003w, 979w, 922w, 882m, 829s, 794m, 755w, 706s, 658w, 584w

**EA:**  $\text{C}_{60}\text{H}_{71}\text{N}_8\text{O}_9\text{PSi}$   $M_r = 1107.31$

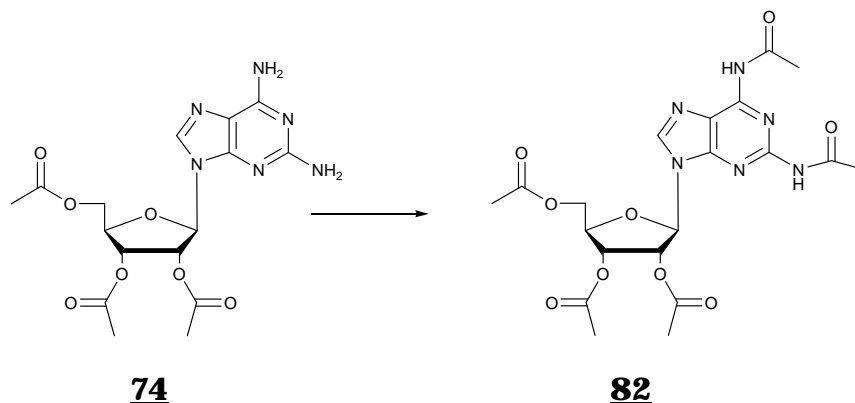
ber.: C 65.08 H 6.46 N 10.12

gef.: C 63.14 H 6.96 N 8.84

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für  $\text{C}_{60}\text{H}_{71}\text{N}_8\text{O}_9\text{PSi}$ : 1148.5

gef.: 1150.0

### 7.2.5.11 Acetylierung von Tri-O-Ac-Diaminopurin **74** zu 9-(2',3',5'-Tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin **82**



Zu 2.86 g des Diaminopurin-Derivats **74** (7 mmol) in 25 ml trockenem Pyridin wurden 100 mg DMAP (0.8 mmol, 0.11 eq.) gegeben und bei 0°C innerhalb von 10 min. 1.5 ml AcOCl (1.65 g, 21 mmol, 3 eq.) getropft. Nach 3 h hydrolysierte man mit 15 ml gesättigter aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und ließ weitere 15 min. rühren. Die Lösung wurde in EtOAc aufgenommen, die wässrige Phase abgetrennt und zweimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 19:1 aufgereinigt. Man erhielt 1.58 g (3.2 mmol, 64%) des Produkts **82** in Form eines weißen Schaums.

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 19:1  $R_f$  = 0.33

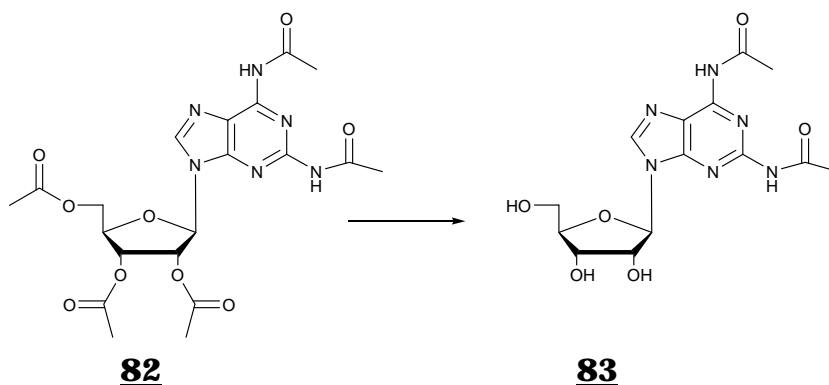
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.16 (s, 0.75 x CH<sub>3</sub>OH), 4.01 (s, 0.75 x CH<sub>3</sub>OH), 4.29-4.46 (m, 3H, 5'-H, 4'-H), 5.77 (dd, J=4.7 Hz, 6.0 Hz, 1H, 3'-H), 5.94 (dd, J=5.0 Hz, 6.0 Hz, 1H, 2'-H), 6.22 (d, J=4.7 Hz, 1H, 1'-H), 8.50 (s, 1H, 8-H), 10.44 (br. s, 1H, N-H), 10.65 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3467w, 3276m, 3221w, 3103m, 2992w, 2940w, 2479w, 1752s, 1623s, 1599s, 1508w, 1490w, 1448m, 1376s, 1232s, 1095m, 1044s, 925m, 903m, 871w, 796m, 734w, 670w, 636m, 599w

**EA:** C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> Mr = 492.44  
 ber.: C 48.78 H 4.91 N 17.07  
 ber. x 0.75 MeOH: C 48.26 H 5.27 N 16.27  
 gef.: C 48.04 H 5.03 N 16.15

**MALDI-MS:** ber. für C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>: 492.16  
 gef.: 492.25

#### 7.2.5.12 Selektive Entschützung zu 9-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin **83**



In 20 ml EtOH wurden bei 0°C 1.96 g (4 mmol) der Verbindung **82** gelöst und 8 ml 2 N aq. NaOH-Lösung zugetropft. Nach 5 min. neutralisierte man mit halbkonzentrierter aq. HCl und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wurde in 20 ml heißem Ethanol aufgenommen und durch Filtration vom Rückstand befreit. Die Lösung wurde bis zur beginnenden Trübung eingeeengt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Man erhielt nach Filtration und Trocknung des Niederschlags 1.34 g eines farblosen Pulvers von **83** (3.64 mmol, 91 %).

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1 R<sub>f</sub> = 0.31

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.50-3.71 (m, 2H, 5'-H), 3.93 (m, 1H, 4'-H), 4.20 (m, 1H, 3'-H), 4.61 (m,



1H, 2'-H), 4.98 (m, 1H, 5'-OH), 5.22 (d, 1H, J=4.7 Hz, 3'-OH), 5.54 (d, 1H, J=5.9 Hz, 2'-OH), 5.91 (d, 1H, J=6.0 Hz, 1'-H), 8.52 (s, 1H, 8-H), 10.37 (s, 1H, NH), 10.54 (s, 1H, NH)

**FT-IR(KBr):** 354s, 2936m, 1706m, 1625s, 1602s, 1522m, 1490w, 1445m, 1410w, 1376s, 1304m, 1243s, 1123w, 1082w, 1055w, 1035w, 992w, 900w, 867w, 794m, 732w, 670w, 633m, 597w

**EA:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> Mr = 366.33

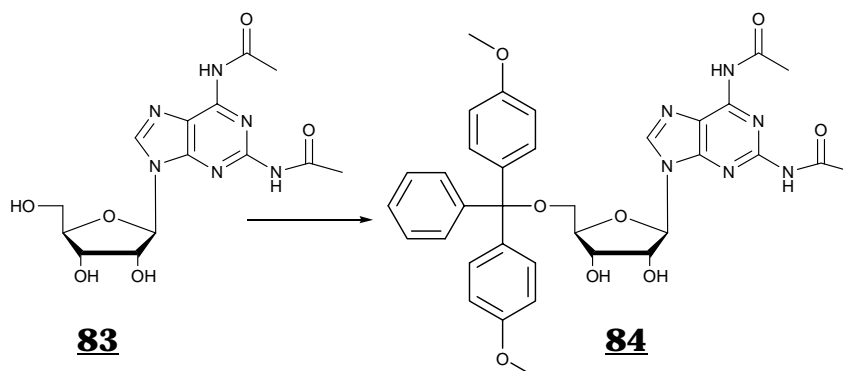
ber.: C 45.90 H 4.95 N 22.94

gef.: C 43.74 H 5.17 N 20.46

**ESI-MS:** ber. für C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>: 366.1

gef.: 365.2

#### 7.2.5.13 Tritylierung zu 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxy triphenylmethyl)-β-D-ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin **84**



In 15 ml trockenem Pyridin wurden 1.1 g Di-N-Ac-Diaminopurin **83** (3 mmol) und 100 mg DMAP (0.8 mmol, 0.27 eq.) gelöst und bei RT unter Argon 1.52 g DMT-Cl (4.5 mmol, 1.5 eq.) zugefügt. Nach 12 h beendete man die Reaktion durch die Zugabe von 10 ml MeOH und überführte die Lösung mit 100 ml EtOAc in einen Scheidetrichter. Es wurden 100 ml gesättigte aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit 100 ml gesättigter aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Der gelbe Rückstand wurde anschließend säulenchromatographisch

mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 19:1 aufgereinigt. Man erhielt 1.75 g (2.61 mmol, 87%) der Verbindung **84** in Form eines farblosen Schaums.

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 19:1      R<sub>f</sub> = 0.29

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.17-3.32 (m, 2H, 5'-H), 3.72 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.07 (m, 1H, 4'-H), 4.35 (m, 1H, 3'-H), 4.73 (m, 1H, 2'-H), 5.19 (d, 1H, J=4.7 Hz, 3'-OH), 5.66 (d, 1H, J=5.9 Hz, 2'-OH), 5.76 (s, 0.4 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 5.97 (d, 1H, J=6.0 Hz, 1'-H), 6.80 (m, 4H, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.19-7.35 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, *p*-Methoxyphenyl-H), 8.44 (s, 1H, 8-H), 10.36 (br. s, 1H, N-H), 10.59 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3374s, 3128w, 3055w, 2932m, 2835w, 2551w, 2048w, 1687s, 1607s, 1534w, 1508s, 1444s, 1399s, 1374s, 1300s, 1248s, 1176m, 1120w, 1082w, 1032m, 988w, 902w, 864w, 827s, 792m, 754w, 727w, 702m, 670w, 630w, 597w

**EA:** C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>      Mr = 668.70

ber.:                      C 62.86      H 5.43      N 12.57

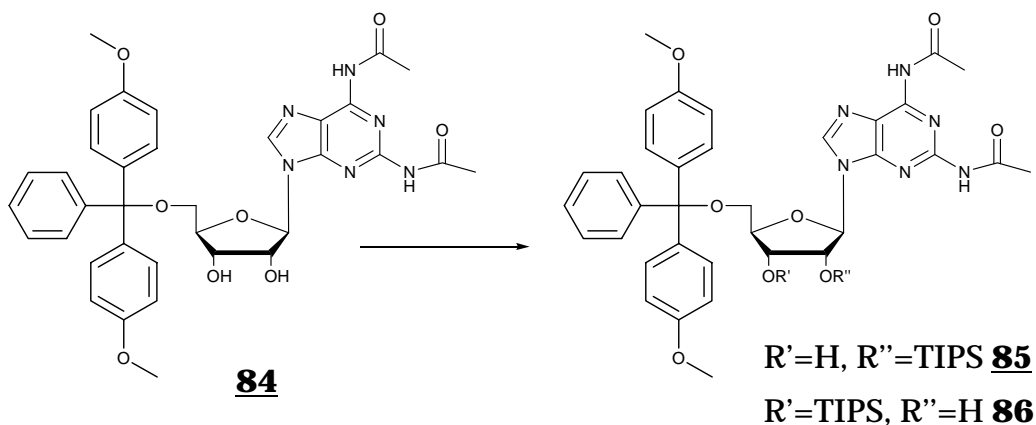
ber. x 0.4 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:    C 60.51      H 5.28      N 11.96

gef.:                      C 60.70      H 5.37      N 12.11

**ESI-MS:**    ber. für C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>:      668.3

gef.:                      667.7

#### 7.2.5.14 Einführung der TIPS-Schutzgruppe an 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin **84**



Zu einer Lösung von 1.67 g Diaminopurin **84** (2.5 mmol) und 1.02 g (15 mmol, 6.0 eq) Imidazol in 25 ml abs. DMF wurden unter einer Argonatmosphäre bei RT 1.1 ml (0.96 g, 5 mmol, 2.0 eq) TIPS-Cl gegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch mit 10 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 50 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 50 ml 5 %iger aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 3:1 aufgereinigt wurde. Die Ausbeute an 2'-O-TIPS-Regioisomer **85** betrug 1.262 g (1.53 mmol, 61 %) und an 3'-O-TIPS-Regioisomer **86** 0.577 g (0.7 mmol, 28 %) in Form eines farblosen Schaums.

#### 9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin **85**

**DC:** EtOAc/n-Hexan = 3:1  $R_f = 0.29$

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 0.83-1.09 (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.21-3.29, (m, 2H, 5'-H), 3.33 (s, 0.5 x H<sub>2</sub>O), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.07 (m, 1H, 4'-H), 4.30 (m, 1H, 3'-H), 4.99 (d, 1H, J=5.8 Hz, 3'-OH), 5.10 (m, 1H, 2'-H), 6.01 (d, 1H, J=3.1 Hz, 1'-H),

6.80 (t, 4H,  $J=9.0$  Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.19-7.34 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, *p*-Methoxyphenyl-H), 8.46 (s, 1H, 8-H), 10.22 (s, 1H, NH), 10.59 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3405m, 3288w, 3102w, 2943s, 2865s, 1725m, 1671m, 1627s, 1596s, 1509s, 1464m, 1446w, 1410w, 1375s, 1304m, 1250s, 1177m, 1152w, 1074w, 1035m, 994w, 916w, 882s, 831s, 755w, 726w, 679s, 584m

**EA:** C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Si Mr = 825.04

ber.: C 64.05 H 6.84 N 10.19

ber. x 0.5 H<sub>2</sub>O: C 63.36 H 6.89 N 10.08

gef.: C 63.08 H 7.00 N 9.91

**ESI-MS:** ber. für C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Si: 824.4

gef.: 823.7

**9-(5'-O-(4,4'-Dimethoxy-triphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2-N,6-N-diacetyl-2,6-diaminopurin 86**

**DC:** EtOAc/n-Hexan = 3:1 R<sub>f</sub> = 0.15

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 0.96-1.05 (m, 21H, Si-Isopropyl-H), 2.20 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.32 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 3.14-3.27 (m, 2H, 5'-H), 3.71 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.02 (m, 1H, 4'-H), 4.39m, 1H, 3'-H), 4.90 (m, 1H, 2'-H), 5.54 (d, 1H,  $J=6.2$  Hz, 2'-OH), 5.93 (d, 1H,  $J=5.3$  Hz, 1'-H), 6.80 (t, 4H,  $J=9.0$  Hz, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.15-7.35 (m, 9H, *o*-Methoxyphenyl-H, *p*-Methoxyphenyl-H), 8.44 (s, 1H, 8-H), 10.31 (br. s, 1H, N-H), 10.59 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3398m, 2943s, 2866m, 1711m, 1686w, 1608s, 1509s, 1464w, 1446m, 1374s, 1300s, 1250s, 1177m, 1148w, 1068m, 1034m, 996w, 918w, 883w, 829s, 792w, 755w, 727w, 684w, 584w

**EA:** C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Si Mr = 825.04

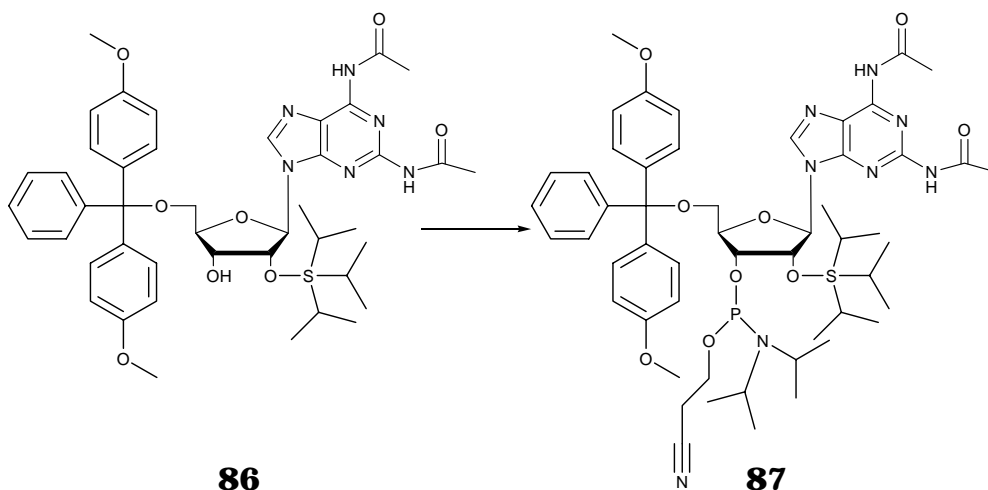
ber.: C 64.05 H 6.84 N 10.19

gef.: C 63.87 H 6.61 N 10.17

**ESI-MS:** ber. für C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Si: 824.4

gef.: 823.7

**7.2.5.15 Synthese des 9-(3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylphosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2N,6N-diacetyl-2,6-diaminopurin 87**



Eine Mischung von 0.825 g Verbindung **85** (1 mmol) und 12 mg (0.1 mmol, 0.1 eq.) DMAP wurde dreimal mit je 5 ml abs. THF koevaporiert und anschließend in 5 ml abs. THF unter einer Argonatmosphäre bei RT gelöst. Hierzu wurden nacheinander 1.04 ml (0.77 g, 4 mmol, 4.0 eq.) Hünig-Base und 0.308 g (1.3 mmol, 1.3 eq.) Diisopropylamino-2-cyanethoxychlorphosphin gegeben. Nach 4 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 5 ml 5 %iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und dreimal mit je 10 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt einen farblosen Schaum, der durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/n-Hexan = 2:1 + 3% NEt<sub>3</sub> aufgereinigt wurde. Die Ausbeute von **87** (2 Diastereomere) betrug 0.79 g (0.77 mmol, 77 %) in Form eines farblosen Schaums.

**DC:** EtOAc/n-Hexan = 2:1 + 3% NEt<sub>3</sub>  $R_f$  = 0.25, 0.29

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 0.72-1.19 (m, 66H, Si-Isopropyl-H, Isopropyl-CH<sub>3</sub>), 2.19, 2.20 (2s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.30, 2.31 (2s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3.32-3.68, (m, 12H, 5'-H, CH<sub>2</sub>-CN, Isopropyliden-CH), 3.72, 3.73 (2s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 4.07 (m, 1H, 4'-H), 4.20, 4.34 (2m, 2H, 3'-H), 5.24, 5.35 (2m, 2H,

2'-H), 6.00 (2d, 2H,  $J=3.1$  Hz, 1'-H), 6.82 (m, 4H, *m*-Methoxyphenyl-H), 7.20-7.37 (m, 18H, Phenyl-H, *o*-Methoxyphenyl-H), 8.46, 8.47 (2s, 2H, 8-H), 10.22 (s, 1H, NH), 10.12, 10.15 (2s, 2H, N-H), 10.60 (br. s, 2H, N-H) (2 Diastereomere)

**$^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta = 148.6, 151.3$  im Verhältnis 1:1

**FT-IR (KBr):** 3217w, 3097w, 2966s, 2867m, 2253w, 1722m, 1669s, 1621s, 1596s, 1509s, 1490w, 1463m, 1374s, 1312m, 1283m, 1250s, 1178s, 1158w, 1128w, 1078m, 1032s, 980m, 923m, 882m, 829s, 791w, 755w, 727w, 687w, 641w, 583

**EA:**  $\text{C}_{53}\text{H}_{75}\text{N}_8\text{O}_9\text{PSi}$  Mr = 1027.3

ber.: C 61.97 H 7.36 N 10.91

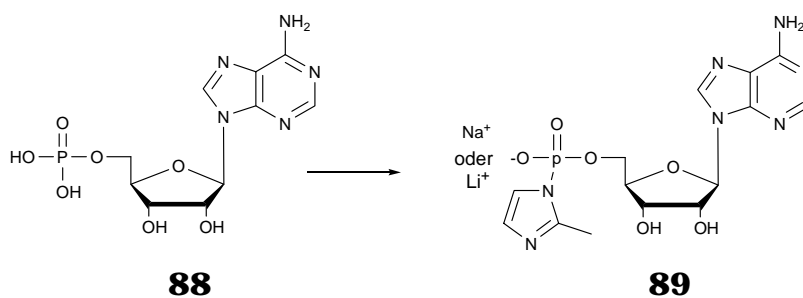
gef.: C 61.78 H 7.57 N 10.82

**ESI-MS:** ber. für  $\text{C}_{63}\text{H}_{77}\text{N}_8\text{O}_9\text{PSi}$ : 1026.5

gef.: 1025.7

## 7.2.6 Synthese der Phosphorimidazole

### 7.2.6.1 Darstellung von Adenosin-5'-[ $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [ $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ ] **89**



Bei RT wurden unter Argon zu einer Lösung von 0.52 g 5'-Adenosinmonophosphorsäure **88** (1.5 mmol) und 1.22 g 2-Methylimidazol (15 mmol, 10.0 eq.) in 10 ml abs. DMSO nacheinander erst 10 ml abs. DMF, dann 0.65 ml  $\text{NEt}_3$  (0.46 g, 4.5 mmol, 3.0 eq.), 0.87 g Triphenylphosphan (3.3 mmol, 2.2 eq.) und 0.99 g Di-(2-pyridyl)-disulfid (4.5 mmol, 3 eq.) gegeben.

Die leuchtend gelbe Lösung rührte man 2 h und tropfte die Reaktionsmischung anschließend langsam unter Rühren zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 1.1 g (9 mmol, 6.0 eq.) Natriumperchlorat oder 0.96 g Lithiumperchlorat (9 mmol, 6.0 eq.) in 450 ml Aceton, 300 ml Diethylether und 35 ml NEt<sub>3</sub>. Das ausgefallene Reaktionsprodukt wurde bei -10°C (Explosionsgefahr) abzentrifugiert, der Niederschlag mehrmals mit Aceton, dann mit Diethylether gewaschen. Man erhielt 0.6 g (1.38 mmol, 92 %) von **[Na<sup>+</sup>]-89** oder 0.52 g (1.35 mmol, 90 %) von **[Li<sup>+</sup>]-89** in Form eines farblosen Pulvers.

**Adenosin-5'-[Na<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] **[Na<sup>+</sup>]-89****

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35     R<sub>f</sub> = 0.65

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.36-3.80 (m, 2H, 5'-H), 3.95 (m, 1H, 3'-H), 4.09 (m, 1H, 3'-H), 4.59 (t, 1H, J=5.4 Hz, 2'-H), 5.10-5.70 (br. s, 2H, 3'-OH), 5.90 (d, J=6.4 Hz, 1H, 1'-H), 6.64 (d, J=1.5 Hz, 1H, Im-4-H oder Im-5-H), 7.09 (d, J=1.5 Hz, 1H, Im-4-H oder Im-5-H), 7.27 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.13 (s, 1H, 2-H), 8.40 (s, 1H, 8-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -8.59

**FT-IR (KBr):** 3334s, 3188s, 2938w, 2372w, 1707m, 1647s, 1602s, 1578m, 1528m, 1478m, 1420m, 1406m, 1372w, 1332w, 1301m, 1267s, 1200m, 1164m, 1103s, 1044s, 991w, 960w, 905m, 873w, 821m, 798w, 755w, 724w, 680w, 650w, 572s

**ESI-MS:** ber. für C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>P<sup>-</sup>: 410.1  
gef.: 410.0

**Adenosin-5'-[Li<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] **[Li<sup>+</sup>]-89****

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35     R<sub>f</sub> = 0.65

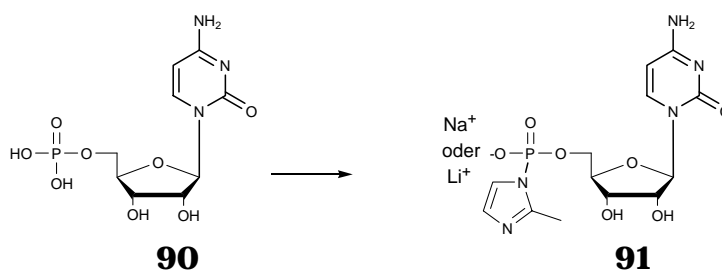
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.70-3.81 (m, 2H, 5'-H), 3.95 (m, 1H, 4'-H), 4.09 (m, 1H, 3'-H), 4.60 (t, 1H, J=5.3 Hz, 2'-H), 5.10-5.70 (br. s, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 5.89 (d, 1H, J=6.0 Hz, 1'-H), 6.60 (d, 1H, J=1.3 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.09 (d, 1H, J=1.2 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.28 (br. s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.13 (2, 1H, 2-H), 8.39 (s, 1H, 8-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -9.18

**FT-IR (KBr):** 3346s, 3204s, 2939m, 2372w, 1910w, 1701w, 1650s, 1603s, 1579m, 1531m, 1480s, 1420m, 1408m, 1374w, 1333w, 1302m, 1267m, 1202m, 1164m, 1107s, 1045s, 993m, 959m, 905m, 874m, 823w, 798w, 754w, 724w, 680w, 650w, 575m

**ESI-MS:** ber. für  $C_{14}H_{17}N_7O_6P^-$ : 410.1  
gef.: 410.1

#### 7.2.6.2 Darstellung von Cytidin-5'-[Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na<sup>+</sup>]/[Li<sup>+</sup>]-**91**



Zu einer Lösung von 0.49 g 5'-Cytosinmonophosphorsäure **90** (1.5 mmol) und 1.22 g 2-Methylimidazol (15 mmol, 10.0 eq.) in 10 ml abs. DMSO wurden bei RT unter Argon nacheinander 10 ml abs. DMF, 0.65 ml NEt<sub>3</sub> (0.46 g, 4.5 mmol, 3.0 eq.), 0.87 g Triphenylphosphan (3.3 mmol, 2.2 eq.) und 0.99 g Di-(2-pyridyl)-disulfid (4.5 mmol, 3 eq.) gegeben. Die leuchtend gelbe Lösung rührte man 2 h und tropfte die Reaktionsmischung anschließend langsam unter Rühren zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 1.1 g (9 mmol, 6.0 eq.) Natriumperchlorat oder 0.96 g Lithiumperchlorat (9 mmol, 6.0 eq.) in 450 ml Aceton, 300 ml Diethylether und 35 ml NEt<sub>3</sub>. Das ausgefallene Reaktionsprodukt wurde bei -10°C (Explosionsgefahr) abzentrifugiert, der Niederschlag mehrmals mit Aceton, dann mit Diethylether gewaschen. Man erhielt 0.56 g (1.37 mmol, 91 %) [Na<sup>+</sup>]-**91** oder 0.54 g (1.38 mmol, 92 %) [Li<sup>+</sup>]-**91** in Form eines farblosen Pulvers.

#### Cytidin-5'-[Na<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na<sup>+</sup>]-**91**

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35  $R_f = 0.70$



**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.70 (m, 2 H, 5'-H), 3.85 (m, 2H, 4'-H, 3'-H), 3.91 (m, 1H, 2'-H), 5.18 (br. s, 2H, 2'-OH) 5.34 (s, 1H, 3'-OH), 5.71 (d, 1H, J=7.4 Hz, 5-H), 5.79 (d, 1 H, J=4.5 Hz, 1'-H), 6.61 (d, 1H, J=1.4 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.07 (d, 1H, J=1.4 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.25 (br. s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.74 (d, 1H, J=7.4 Hz, 6-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = -8.76

**FT-IR (KBr):** 3438s, 3336s, 3200s, 2943m, 1710w, 1654s, 1608s, 1531m, 1487s, 1406m, 1376m, 1291m, 1249s, 1198m, 1164w, 1130w, 1108m, 1091m, 1044m, 947m, 914w, 872w, 830m, 792m, 759w, 681w, 636w, 577s

**ESI-MS:** ber. für C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P<sup>-</sup>: 386.1  
gef.: 386.1

**Cytidin-5'-[Li<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [Li<sup>+</sup>]-91**

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35 R<sub>f</sub> = 0.69

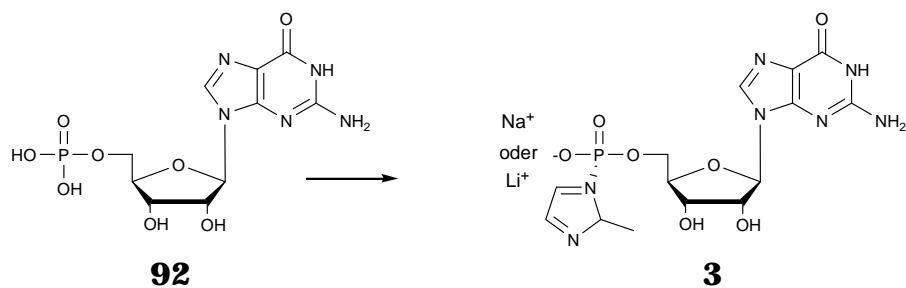
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.65, 3.74 (m, 2H, 5'-H), 3.84, (m, 2H, 4'-H, 3'-H), 3.90 (m, 1H, 2'-H), 5.31 (br. s, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 5.68 (d, 1H, J=7.4 Hz, 5-H), 5.79 (d, 1 H, J=4.5 Hz, 1'-H), 6.61 (d, 1H, J=1.4 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.08 (d, 1H, J=1.4 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.70 (d, 1H, J=7.4 Hz, 6-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = -9.23

**FT-IR (KBr):** 3347s, 2939m, 2368w, 1654s, 1609s, 1529m, 1494s, 1458w, 1405m, 1375w, 1288s, 1201m, 1164m, 1107s, 1047s, 994m, 907w, 874w, 788m, 756w, 680w, 576m

**ESI-MS:** ber. für C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P<sup>-</sup>: 386.1  
gef.: 386.0

### 7.2.6.3 Darstellung von Guanosin-[Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na<sup>+</sup>]-3 [Li<sup>+</sup>]-3



Bei RT gab man zu einer Lösung von 0.55 g 5'-Guanosinmonophosphorsäure **92** (1.5 mmol) und 1.22 g 2-Methylimidazol (15 mmol, 10.0 eq.) in 10 ml abs. DMSO unter Argon nacheinander 10 ml abs. DMF, 0.65 ml NEt<sub>3</sub> (0.46 g, 4.5 mmol, 3.0 eq.), 0.87 g Triphenylphosphan (3.3 mmol, 2.2 eq.) und 0.99 g Di-(2-pyridyl)-disulfid (4.5 mmol, 3 eq.). Die leuchtend gelbe Lösung rührte man 2 h und tropfte sie anschließend langsam unter Rühren zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 1.1 g (9 mmol, 6.0 eq.) Natriumperchlorat oder 0.96 g Lithiumperchlorat (9 mmol, 6.0 eq.) in 450 ml Aceton, 300 ml Diethylether und 35 ml NEt<sub>3</sub>. Das ausgefallene Reaktionsprodukt wurde bei -10°C (Explosionsgefahr) abzentrifugiert, der Niederschlag mehrmals mit Aceton, dann mit Diethylether gewaschen. Man erhielt 0.63g (1.4 mmol, 93 %) [Na<sup>+</sup>]-**92** oder 0.56 g (1.34 mmol, 89 %) [Li<sup>+</sup>]-**3** in Form eines farblosen Pulvers.

#### Guanosin-[Na<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na<sup>+</sup>]-**3**

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35      R<sub>f</sub> = 0.70

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.63 und 3.74 (m, 2H, 5'-H), 3.88 (m, 1H, 3'-H), 4.01 (m, 1H, 3'-H), 4.49 (t, 1H, J=5.4 Hz, 2'-H), 5.26 (s, 1H, 2'-OH), 5.44 (s, 1H, 3'-OH), 5.67 (d, J=6.4 Hz, 1H, 1'-H), 6.59 (d, J=1.5 Hz, 1H, Im-4-H oder Im-5-H), 6.73 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.06 (d, J=1.5 Hz, 1H, Im-4-H oder Im-5-H), 7.86 (s, 1H, 8-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -8.60

**FT-IR (KBr):** 3325s, 3126s, 2760w, 1696s, 1610m, 1577w, 1534s, 1484m, 1405m, 1375w, 1301w, 1262s, 1200s, 1179w, 1184w, 1102s, 1040s, 990w, 954w, 906w, 864w, 804w, 779w, 756w, 681m, 638w, 572s

**ESI-MS:** ber. für  $C_{14}H_{17}N_7O_7P^-$ : 426.1  
gef.: 426.1

**Guanosin-[Li<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [Li<sup>+</sup>]-3**

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35  $R_f = 0.71$

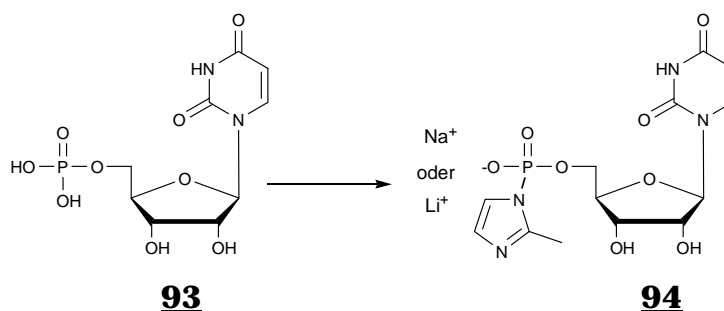
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta = 2.38$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.63, 3.74 (m, 2H, 5'-H), 3.89 (m, 1H, 3'-H), 4.01 (m, 1H, 3'-H), 4.50 (t, 1H,  $J=5.4$  Hz, 2'-H), 5.25 (s, 1H, 2'-OH), 5.45 (s, 1H, 3'-OH), 5.67 (d,  $J=6.4$  Hz, 1H, 1'-H), 6.59 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H, Im-4-H oder Im-5-H), 6.82 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.09 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H, Im-4-H oder Im-5-H), 7.90 (s, 1H, 8-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta = -9.13$

**FT-IR (KBr):** 3383s, 3133s, 2966w, 2372w, 1694s, 1611m, 1579w, 1534m, 1483m, 1406m, 1376w, 1301w, 1261m, 1201m, 1179w, 1103s, 1043s, 992w, 955w, 906w, 868w, 805m, 780w, 754w, 681w, 638w, 576m

**ESI-MS:** ber. für  $C_{14}H_{17}N_7O_7P^-$ : 426.1  
gef.: 426.1

**7.2.6.4 Darstellung von Uridin-[Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [Na<sup>+</sup>]/[Li<sup>+</sup>] 94**



Unter Argon löste man 0.49 g 5'-Uridinmonophosphorsäure **93** (1.5 mmol) und 1.22 g 2-Methylimidazol (15 mmol, 10.0 eq.) in 10 ml abs. DMSO. Dazu wurden nacheinander 10 ml abs. DMF, 0.65 ml NEt<sub>3</sub> (0.46 g, 4.5 mmol, 3.0 eq.), 0.87 g

Triphenylphosphan (3.3 mmol, 2.2 eq.) und 0.99 g Di-(2-pyridyl)-disulfid (4.5 mmol, 3 eq.) gegeben. Die leuchtend gelbe Lösung rührte man 2 h und tropfte sie anschließend langsam unter Rühren zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 1.1 g (9 mmol, 6.0 eq.) Natriumperchlorat oder 0.96 g Lithiumperchlorat (9 mmol, 6.0 eq.) in 450 ml Aceton, 300 ml Diethylether und 35 ml NEt<sub>3</sub>. Das ausgefallene Reaktionsprodukt wurde bei -10°C (Explosionsgefahr) abzentrifugiert, der Niederschlag mehrmals mit Aceton, dann mit Diethylether gewaschen. Man erhielt 0.59 g (1.44 mmol, 96 %) [**Na**<sup>+</sup>]-**94** oder 0.55 g (1.40 mmol, 93 %) [**Li**<sup>+</sup>]-**94** in Form eines farblosen Pulvers.

**Uridin-[Na<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [**Na**<sup>+</sup>]-**94****

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35     R<sub>f</sub> = 0.71

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.68-3.85 (m, 2H, 5'-H), 3.88 (m, 2H, 4'-H, 3'-H), 4.03 (t, 1H, J=3.0 Hz, 2'-H), 4.63 (2s, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 5.54 (d, 1H, J=8.0 Hz, 5-H), 5.77 (d, 1H, J=3.0 Hz, 1'-H), 6.65 (d, 1H, J=1.3 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.08 (d, 1H, J=1.3 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.77 (d, 1H, J=8.0 Hz, 6-H), 11.31 (br. s, 1H, NH)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -8.73

**FT-IR (KBr):** 3397s, 2940w, 2812w, 1694s, 1570w, 1560w, 1528m, 1467s, 1401m, 1627s, 1200s, 1163m, 1101s, 1045s, 993m, 954w, 906w, 869w, 816s, 764m, 721w, 680m, 571s

**ESI-MS:** ber. für C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>P<sup>-</sup>:     387.1  
gef.:     387.0

**Uridin-[Li<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [**Li**<sup>+</sup>]-**94****

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35     R<sub>f</sub> = 0.70

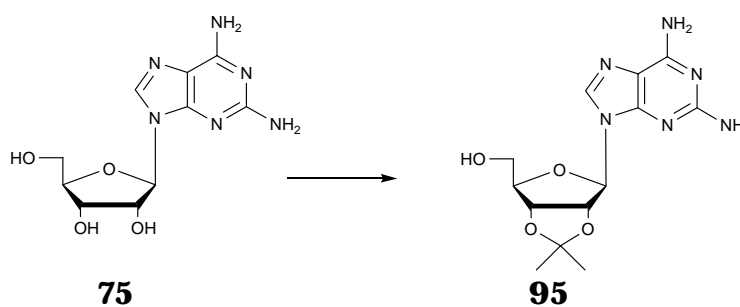
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.68-3.83 (m, 2H, 5'-H), 3.88 (m, 2H, 4'-H, 3'-H), 4.04 (t, 1H, J=3.0 Hz, 2'-H), 4.63 (2s, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 5.55 (d, 1H, J=8.0 Hz, 5-H), 5.76 (d, 1H, J=3.0 Hz, 1'-H), 6.61 (d, 1H, J=1.3 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.09 (d, 1H, J=1.3 Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.75 (d, 1H, J=8.0 Hz, 6-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -9.23

**FT-IR (KBr):** 3421s, 2367s, 1701s, 1560w, 1532w, 1473m, 1406m, 1270s, 1201s, 1164w, 1108s, 1042m, 992m, 952w, 906w, 870w, 816s, 762m, 722w, 680w, 570s

**ESI-MS:** ber. für  $C_{13}H_{16}N_4O_8P^-$ : 387.1  
gef.: 387.0

#### 7.2.6.5 Synthese von 2',3'-O-Isopropyliden-9-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin **95**



Zu einer Suspension von 0.57 g Diaminopurin-nucleosid **75** (2 mmol) in 30 ml trockenem Aceton tropfte man bei RT 0.18 ml einer 70 %igen aq.  $HClO_4$ -Lösung. Nach 12 h Rühren neutralisierte man mit konz.  $NH_4OH$  und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der Feststoff wurde mit  $CH_2Cl_2/MeOH = 9:1$  säulenchromatographisch aufgereinigt. Man erhielt 0.59 g der Verbindung **95** in Form eines farblosen Pulvers (1.82 mmol, 91 %).

**DC:** EtOAc/ $H_2O$ /EtOH/ $HOAc = 16:4:4:1$   $R_f = 0.84$

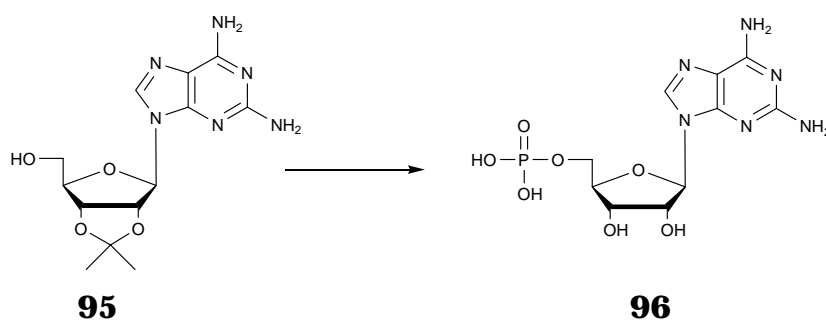
**$^1H$ -NMR (250 MHz,  $d_6$ -DMSO):**  $\delta = 1.34$  (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.54 (s, 3H,  $CH_3$ ), 3.51-3.59 (m, 2H, 5'-H), 4.14 (m, 1H, 4'-H), 5.00 (m, 1H, 3'-H), 5.18-5.28 (m, 2H, 2'-H, 5'-OH), 5.97 (d,  $J=2.9$  Hz, 1H, 1'-H), 5.82 (s, 2H,  $NH_2$ ), 6.76 (s, 2H,  $NH_2$ ), 7.92 (s, 1H, 8-H)

**FT-IR (KBr):** 3343s, 3202s, 2987m, 2936m, 2870w, 2131w, 1600s, 1511w, 1478m, 1416m, 1384w, 1346w, 1274m, 1215m, 1156m, 1104s, 1078s, 971w, 949w, 910w, 851m, 791m, 743w, 682w, 638m, 557w

**EA:**  $C_{13}H_{18}N_6O_4$   $Mr = 322.32$   
ber.: C 48.44 H 5.63 N 26.07

gef.:	C 46.33	H 5.89	N 23.60
<b>MALDI<sup>+</sup>-MS:</b>	ber. für C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> :		322.14
	gef.:		323.34

#### 7.2.6.6 Phosphorylierung zu 9-( $\beta$ -D-ribofuranosyl-5'-phosphorsäure)-2,6-diaminopurin **96**



Bei 0°C wurden 0.74 ml frisch destilliertes POCl<sub>3</sub> (8 mmol, 4 eq.) unter Argonatmosphäre zu einer Lösung von 0.65 g 2',3'-O-Isopropyliden-2-Aminoadenosin **95** (2 mmol) in 15 ml abs. Triethylphosphat bei getropft. Nach 2 h Rühren bei RT wurde die klare Lösung mit 10 ml Wasser versetzt und weitere 12 h gerührt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Die Mischung wurde mit 10 %iger aq. LiOH neutralisiert, das ausgefallene Reaktionsprodukt abfiltriert, mehrmals mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Der weiße Feststoff wurde aus 1 M aq. HCl umkristallisiert. Man erhielt 0.60 g von **96** (1.66 mmol, 83 %) in Form eines farblosen Pulvers.

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35      R<sub>f</sub> = 0.55

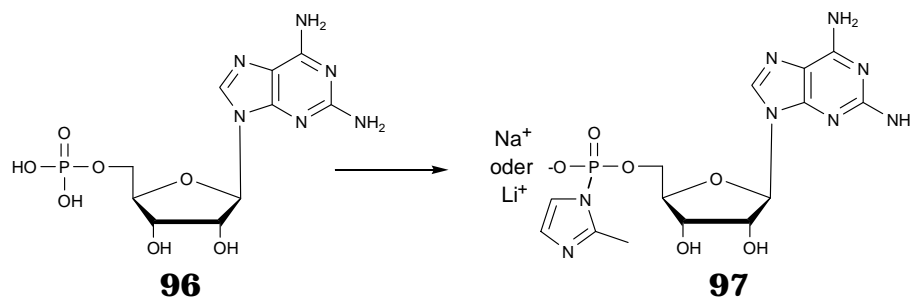
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  = 3.69 (m, 2H, 5'-H), 4.04 (m, 1H, 4'-H), 4.19 (dd, 1H, J=5.1 Hz, 3.4 Hz, 3'-H), 4.47 (t, 1H, J=5.6 Hz, 2'-H), 5.65 (d, 1H, J=6.3 Hz, 1'-H), 7.96 (s, 1H, 8-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  = 4.78

**FT-IR (KBr):** 3330s, 3177s, 2368w, 1709s, 1653s, 1595m, 1578w, 1527m, 1490w, 1458w, 1405m, 1324w, 1290w, 1217w, 1178w, 1038w, 969w, 941w, 861w, 796m, 770w, 724w, 671w, 658w, 637w

**ESI-MS:** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>P: 362.1  
 gef.: 361.1

**7.2.6.7 Synthese von 9-([Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-(2-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat]-  
 β-D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin [Na<sup>+</sup>]-/[Li<sup>+</sup>] **97****



272 mg des 2,6-Diaminopurinnucleotids **96** (0.75 mmol) und 0.62 g 2-Methylimidazol (7.5 mmol, 10.0 eq.) wurden unter einer Argonatmosphäre in 10 ml warmem abs. DMSO gelöst. Hierzu wurden 10 ml DMF, 0.32 ml Et<sub>3</sub>N (2.25 mmol, 3 eq.) und 0.43 g Triphenylphosphan (1.65 mmol, 2.2 eq.) gegeben und die Mischung bis zur vollständigen Lösung aller Reaktanden leicht erwärmt. Nach Zugabe von 0.5 g (2.25 mmol, 3.0 eq.) Di-(2-pyridyl)-disulfid wurde die Lösung für 2 h bei RT gerührt. Anschließend tropfte man die Reaktionsmischung langsam unter Rühren zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 0.55 g (4.5 mmol, 6.0 eq.) Natriumperchlorat oder 0.48 g (4.5 mmol, 6.0 eq.) Lithiumperchlorat in 200 ml Aceton, 125 ml Diethylether und 15 ml NEt<sub>3</sub>. Das ausgefallene Reaktionsprodukt wurde vorsichtig bei -10°C (Explosionsgefahr) abzentrifugiert und mehrmals mit Aceton, abschließend mit Diethylether gewaschen. Man erhielt 0.32 g (0.71 mmol, 94 %) [**Na<sup>+</sup>**]-**97** oder 0.29 g (0.68 mmol, 91 %) [**Li<sup>+</sup>**]-**97** in Form eines farblosen Pulvers.

**9-([Na<sup>+</sup>-(2-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat]-β-D-  
 ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin [Na<sup>+</sup>]-**97****

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35  $R_f$  = 0.75

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.64 (m, 1H, 5'-H), 3.76 (m, 1H, 5'-H), 3.90 (m, 1H, 4'-H), 4.03 (dd, 1H, J=4.7 Hz, 3.0 Hz, 3'-

H), 4.52 (t, 1H,  $J=5.5$  Hz, 2'-H), 5.28, 5.41 (br. s, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 5.71 (d, 1H,  $J=6.2$  Hz, 1'-H), 5.81 (br. s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.60 (t, 1H,  $J=1.2$  Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 6.73 (br. s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.07 (t, 1H,  $J=1.2$  Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.94 (s, 1H, 8-H)

**$^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta = -8.73$

**FT-IR (KBr):** 3354s, 3212s, 2936w, 1647m, 1603m, 1508w, 1479m, 1412s, 1345m, 1273s, 1200m, 1163w, 1102s, 1046m, 990w, 905w, 878w, 790m, 744w, 680w, 573m

**ESI-MS:** ber. für  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_6\text{P}^-$ : 425.1  
gef.: 425.1

**9-([Li<sup>+</sup>-(2-Methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat]- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,6-diaminopurin [Li<sup>+</sup>]-97**

**DC:** i-PrOH/ $\text{NH}_3$ / $\text{H}_2\text{O}$  = 55:10:35  $R_f = 0.75$

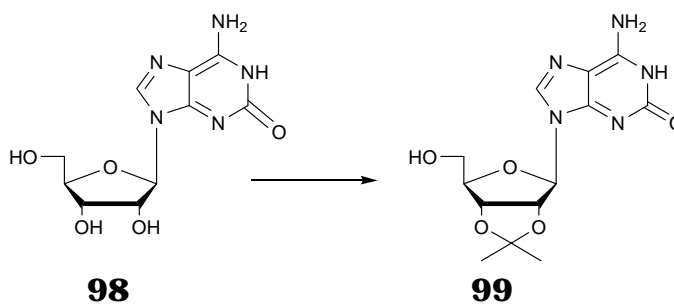
**$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta = 2.38$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.64 (m, 1H, 5'-H), 3.75 (m, 1H, 5'-H), 3.89 (m, 1H, 4'-H), 4.02 (dd, 1H,  $J=4.7$  Hz, 3.0 Hz, 3'-H), 4.52 (t, 1H,  $J=5.5$  Hz, 2'-H), 5.38-5.41 (br. s, 2H, 2'-OH, 3'-OH), 5.70 (d, 1H,  $J=6.2$  Hz, 1'-H), 5.79 (br. s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.59 (t, 1H,  $J=1.2$  Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 6.69 (br. s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.08 (t, 1H,  $J=1.2$  Hz, Im-4-H oder Im-5-H), 7.92 (s, 1H, 8-H)

**$^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta = -9.11$

**FT-IR (KBr):** 3358s, 3213m, 2937w, 1638s, 1603s, 1508w, 1482m, 1412s, 1364w, 1275s, 1201m, 1164w, 1105s, 1048w, 990m, 906w, 670w, 791w, 751w, 700w, 680w, 638w, 575m

**ESI-MS:** ber. für  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_6\text{P}^-$ : 425.1  
gef.: 425.2



7.2.6.8 Synthese von 2',3'-O-Isopropyliden-iso-guanosin **99**

Zu einer Suspension von 0.57 g Iso-Guanosin **97** (5 mmol) in 75 ml trockenem Aceton tropfte man bei RT 0.45 ml einer 70 %igen aq. HClO<sub>4</sub>-Lösung. Nach 12 h Rühren neutralisierte man mit konz. NH<sub>4</sub>OH und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der Feststoff wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1 chromatographisch aufgereinigt. Man erhielt 1.15 g eines farblosen Pulvers (3.55 mmol, 71 %) der Verbindung **98**.

**DC:** EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc = 16:4:4:1  $R_f = 0.63$

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta = 1.30$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.33 (s, 0.3 x H<sub>2</sub>O), 3.51 (m, 2H, 5'-H), 4.10 (m, 1H, 4'-H), 4.96 (dd, J=6.0 Hz, 3.8 Hz, 1H, 3'-H), 5.02 (d, J=5.3 Hz, 1H, 5'-OH), 5.17 (dd, 1H, J=5.7, 2.5 Hz, 2'-H), 5.91 (d, J=3.1 Hz, 1H, 1'-H), 7.81 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.90 (s, 1H, 8-H), 10.65 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3230w, 3059m, 2784w, 2345w, 1711s, 1671s, 1639s, 1525m, 1458m, 1399m, 1321w, 1239w, 1215w, 1177w, 1115s, 1027w, 942s, 852s, 773m, 756w, 703w, 679w, 634s, 585m

**EA:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>  $Mr = 323.30$

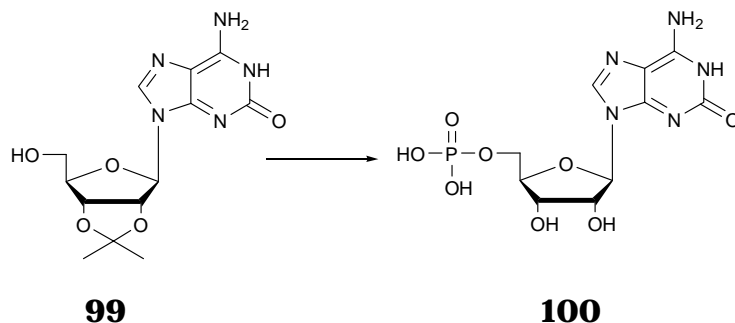
ber.: C 48.29 H 5.30 N 21.66

ber. x 0.3 H<sub>2</sub>O: C 47.50 H 5.40 N 21.31

gef.: C 47.30 H 5.24 N 21.30

**ESI-MS:** ber. für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 323.1

gef.: 321.9

**7.2.6.9 Synthese von iso-Guanosin-5'-Phosphorsäure 100**

In 30 ml Triethylphosphat suspendierte man 0.647 g (2mmol) iso-Guanosin **99** und kühlte auf 0°C ab. Dazu tropfte man 0.75 ml frisch destilliertes POCl<sub>3</sub> (1.23 g, 8 mmol, 4 eq.) und ließ 30 min. rühren. Dann erwärmte man auf RT und nach weiteren 3 h versetzte man die nun klare Lösung mit 5 ml Wasser, rührte 12 h bei RT und neutralisierte anschließend mit 10% aq. LiOH. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Umkristallisation aus 1 M aq. HCl lieferte das Produkt **100** als farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 0.44 g (1.22 mmol, 61 %).

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35      R<sub>f</sub> = 0.53

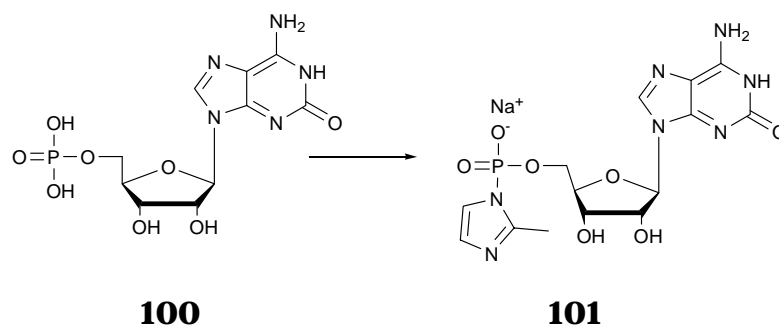
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ = 4.03 (m, 2H, 5'-H), 4.31 (m, 1H, 4'-), 4.38 (m, 1H, 3'-H), 4.58 (t, J=5.5 Hz, 1H, 2'-H), 5.80 (d, J=5.8 Hz, 1H, 1'-H), 8.12 (s, 1H, 8-H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ = 0.77

**FT-IR (KBr):** 3131s, 2975w, 2365w, 1691s, 1617m, 1527w, 1479w, 1451w, 1393m, 1366w, 1304w, 1220m, 1175w, 1139w, 1079m, 994w, 960m, 874w, 800w, 759w, 713w, 684w

**ESI-MS:** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>P:      363.1  
gef.:    362.0

### 7.2.6.10 Umsetzung zu iso-Guanosin-[Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-(2-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat] [**Na<sup>+</sup>**]-**101**



363 mg iso-Guanosin-5'-Phosphorsäure **100** (1 mmol) und 0.82 g 2-Methylimidazol (10 mmol, 10.0 eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 10 ml warmem abs. DMSO gelöst. Hierzu wurden 10 ml DMF, 0.42 ml Et<sub>3</sub>N (0.304 g, 3 mmol, 3 eq.) und 0.577 g Triphenylphosphan (2.2 mmol, 2.2 eq.) gegeben und die Mischung bis zur vollständigen Lösung aller Reaktanden leicht erwärmt. Nach Zugabe von 0.66 g (3 mmol, 3.0 eq.) Di-(2-pyridyl)-disulfid wurde die Lösung für 2 h bei RT gerührt. Anschließend tropfte man die Reaktionsmischung langsam unter Rühren zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 0.74 g (6 mmol, 6.0 eq.) NaClO<sub>4</sub> in 200 ml Aceton, 125 ml Diethylether und 15 ml NEt<sub>3</sub>. Das ausgefallene Reaktionsprodukt wurde vorsichtig bei -10°C (Explosionsgefahr) abzentrifugiert und mehrmals mit Aceton, abschließend mit Diethylether gewaschen. Man erhielt 337 mg (0.79 mmol, 79 %) [**Na<sup>+</sup>**]-**101** in Form eines farblosen Pulvers.

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35      R<sub>f</sub> = 0.73

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.69 (m, 2H, 5'-H), 3.91 (m, 1H, 3'-H), 4.02 (m, 1H, 3'-H), 4.45 (t, 1H, J=5.4 Hz, 2'-H), 5.25 (br. s, 1H, 2'-OH), 5.45 (br. s, 1H, 3'-OH) 5.67 (d, J=6.4 Hz, 1H, 1'-H), 6.60 (d, J=1.5 Hz, 1H, Im-4-H oder Im-5-H), 7.07 (d, J=1.5 Hz, 1H, Im-4-H oder Im-5-H), 7.96 (s, 1H, 8-H)

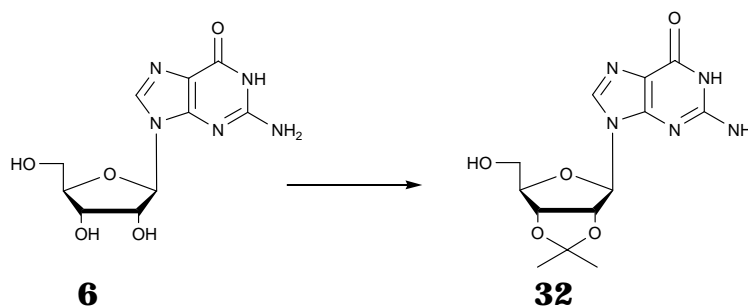
**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = -9.09

**FT-IR (KBr):** 3342s, 1345w, 1676s, 1629s, 1528m, 1403s, 1299w, 1263m, 1200m, 1162w, 1102s, 989m, 904w, 866w, 804w, 779w, 680w, 634w, 573m

**ESI-MS:** ber. für  $C_{14}H_{17}N_7O_7P^-$ : 426.1  
gef.: 426.1

## 7.2.7 Synthese von Guanosin-5'-thiophosphat

### 7.2.7.1 Synthese von 2',3'-O-Isopropyliden-guanosin 32



Zu einer Suspension von 14.17 g Guanosin 6 (50 mmol) in 700 ml trockenem Aceton wurden innerhalb von 5 min. bei RT 4.8 ml 70 %ige aq.  $HClO_4$ -Lösung (55 mmol, 1.1 eq.) getropft. Nach einigen Minuten klarte die Lösung auf und man ließ weitere 60 min. rühren. Dann neutralisierte man durch mit 4.1 ml konz.  $NH_4OH$  (60 mmol), wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Das Lösungsmittel wurde weitgehend im Vakuum entfernt, der Feststoff abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Man erhielt 11.97 g von 32 in Form eines farblosen Feststoffs (37 mmol, 74 %).

**DC:** EtOAc/EtOH/ $H_2O$ /HOAc = 16:4:4:1  $R_f$  = 0.65

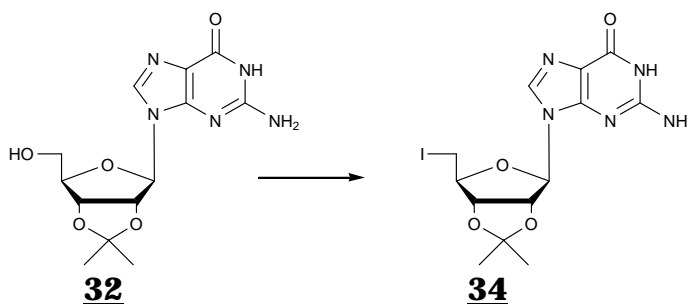
**$^1H$ -NMR (250 MHz,  $d_6$ -DMSO):**  $\delta$  = 1.30 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.50 (s, 3H,  $CH_3$ ), 3.33 (s, 0.3 x  $H_2O$ ), 3.51 (m, 2H, 5'-H), 4.10 (m, 1H, 4'-H), 4.96 (dd,  $J=3.1$  Hz, 3.6 Hz, 1H, 3'-H), 5.02 (t,  $J=5.5$  Hz, 1H, 5'-OH), 5.17 (dd, 1H,  $J=2.8$ , 3.7, 2'-H), 5.91 (d,  $J=2.8$  Hz, 1H, 1'-H), 6.49 (s, 2H,  $NH_2$ ), 7.90 (s, 1H, 8-H), 10.65 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3318w, 3160w, 2990w, 2939w, 2748w, 2041w, 1694s, 1636s, 1596s, 1541m, 1488m, 1385m, 1310w, 1271w, 1173w, 1086w, 967w, 950w, 885w, 830w, 119m, 679m, 636m, 578w

**EA:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> Mr = 323.30  
 ber.: C 48.29 H 5.30 N 21.66  
 ber. x 0.3 H<sub>2</sub>O: C 47.50 H 5.40 N 21.31  
 gef.: C 47.70 H 5.36 N 21.21

**ESI-MS:** ber. für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 323.1  
 gef.: 322.1

#### 7.2.7.2 Iodierung zu 2',3'-O-Isopropyliden-5'-deoxy-5'-iodo-guanosin **34**



Zu einer auf  $-78^{\circ}\text{C}$  gekühlten Suspension von 3.23 g 2',3'-O-Isopropyliden-Guanosin **32** (10 mmol) in 20 ml abs. THF fügte man 6.78 g Methyltriphenoxyphosphonium-Iodid MPTI (15 mmol, 1.5 eq.). Nach 10 min. ließ man auf RT erwärmen und rührte weitere 4 h. Nach der Zugabe von 10 ml MeOH wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether/n-Hexan = 1:1 suspendiert, der Feststoff abfiltriert und mit Diethylether/n-Hexan sorgfältig gewaschen. Das gelbe Pulver wurde durch Flash-Chromatographie mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH im Verhältnis 19:1 aufgereinigt. Man erhielt ein blassgelbes Pulver von **34** mit einer Ausbeute von 1.19 g (3.03 mmol, 30%).

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35 R<sub>f</sub> = 0.88

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 1.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). 1.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.52 (m, 2H, 5'-H), 4.14 (m, 1H, 4'-H), 4.97 (dd, J=2.8 Hz, 3.4 Hz, 1H, 3'-H),

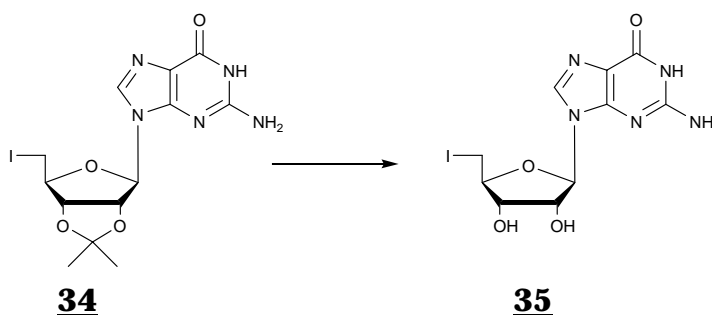
5.19 ( dd,  $J=2.8$  Hz, 3.4 Hz, 1H, 2'-H), ), 5.92 (d,  $J=2.8$  Hz, 1H, 1'-H), 6.53 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.91 (s, 1H, 8-H), 10.69 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3470w, 3338s, 3110s, 2990m, 2939w, 2757m, 2367w, 1734s, 1654m, 1618m, 1584m, 1551s, 1488s, 1420w, 1376s, 1318w, 1269w, 1236w, 1212s, 1179w, 1157m, 1089s, 1043w, 1000w, 970w, 928w, 861s, 824w, 776m, 740w, 679m, 6935w, 601w

**EA:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub> Mr = 433.20  
 ber.: C 36.04 H 3.72 N 16.17  
 gef.: C 32.38 H 3.47 N 13.52

**MALDI-MS:** ber. für C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 433.02  
 gef.: 433.02

### 7.2.7.3 Synthese von 5'-Deoxy-5'-iodo-guanosin 35



Eine Suspension von 0.86 g 5'-Iod-2',3'-O-Isopropyliden-Guanosin 34 in 8 ml 90 %iger aq. HCOOH wurde 24 h bei RT gerührt. Nach dem Entfernen der Säure im Vakuum neutralisierte man den Rückstand mit wenig konz. NH<sub>4</sub>OH, filtrierte den Feststoff ab und wusch mit Wasser nach. Nach dem Trocknen im Vakuum erhielt man 0.63 g eines farblosen Pulvers (1.6 mmol, 80%) der Verbindung 35.

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35 R<sub>f</sub> = 0.76

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 3.38-3.60 (m, 2H, 5'-H), 3.94 (m, 1H, 4'-H), 4.07 (m, 1H, 3'-H), 4.63 (dd,  $J=10.7$  Hz, 5.3 Hz, 1H, 2'-H), 5.36 (d,

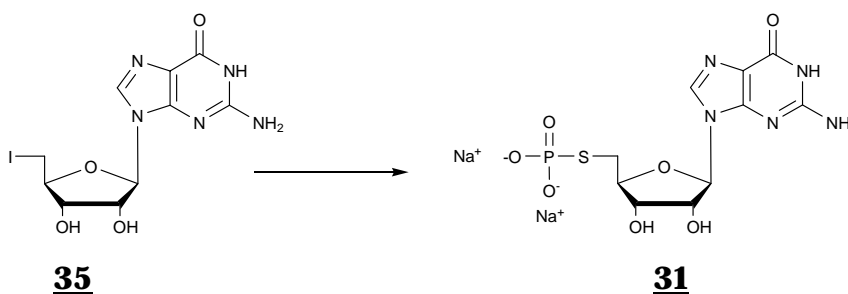
$J=4.4$  Hz, 1H, 1'-H), 5.52 (d,  $J=5.7$  Hz, 1H, 2'-OH), 5.79 (d,  $J=6.0$  Hz, 1H, 3'-OH), 6.48 (br. s, 2H, NH<sub>2</sub>) 7.92 (s, 1H, 8-H), 10.60 (s, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3308m, 3118s, 2752w, 2366w, 1689s, 1648w, 1612m, 1578w, 1533s, 1482s, 1408m, 1375m, 1241m, 1178m, 1121s, 1071w, 1050m, 1012w, 933m, 878w, 812s, 780m, 691w, 636w, 575w

**EA:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub> Mr = 393.14  
 ber.: C 30.55 H 3.08 N 17.81  
 gef.: C 30.33 H 3.31 N 16.50

**MALDI-MS:** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 393.14  
 gef.: 393.12

#### 7.2.7.4 Darstellung von 5'-Deoxy-5'-thioguanosin-5'-monophosphat **31**



In 25 ml Wasser wurden 0.59 g 5'-Iod-Guanosin **35** (1.5 mmol) suspendiert. Dazu wurden portionsweise 1.35 g Na<sub>3</sub>SPO<sub>3</sub> (7.5 mmol, 5eq.) zugefügt. Nach 1 d bildete sich eine klare Lösung. Man ließ weitere 3 d rühren. Nach der Zugabe von 25 ml MeOH zentrifugierte man den ausgefallenen Feststoff ab und versetzte den Überstand mit 4 ml einer 0.5 M aq. Ba(OAc)<sub>2</sub>-Lösung (2 mmol, 1.3 eq.). Das gebildete Bariumthiophosphat wurde durch Zentrifugation entfernt. Das Bariumsalz des Guanosin-5'-thiophosphats wurde durch das doppelten Volumen an EtOH ausgefällt. Das getrocknete Salz wurde mit 1.5 ml einer 1 M aq. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.5 mmol, 1 eq.) 1 h bei RT gerührt. Dann entfernte man ausgefallenes BaSO<sub>4</sub> durch Filtration und fällte das Natriumsalz des Guanosin-5'-thiophosphats durch die Zugabe von Aceton aus. Man erhielt nach dem Trocknen im Vakuum 0.38 g eines farblosen Pulvers von **31** (0.89 mmol, 59 %).

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35 R<sub>f</sub> = 0.58

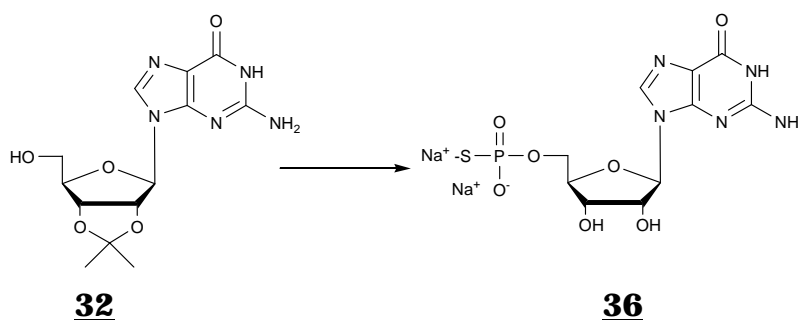
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):** 3.98 (m, 2H, 5'-H), 4.27 (m, 1H, 4'-H), 4.43 (m, 1H, 3'-H), 4.66 (m, 1H, 2'-H), 5.84 (d, J=6.0 Hz, 1H, 1'-H), 8.17 (s, 1H, 8H)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ = 17.56, Thiophosphat bei 3

**FT-IR (KBr):** 3325s, 3124s, 2756m, 1700s, 1607s, 1534m, 1484m, 412m, 375s, 1233w, 1128s, 987w, 932w, 804w, 781w, 733w, 692w, 639w, 573w

**ESI-MS:** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>PS: 379.0  
gef.: 378.1

#### 7.2.7.5 Synthese des Guanosin-5'-O-monophosphorthioat GMPS 36



In 6 ml trockenem Pyridin wurde unter Argon Atmosphäre 0.32 g 2',3'-Isopropyliden-guanosin 32 (1 mmol) gelöst und bei 0°C 0.41 ml Thiophosphorylchlorid (0.68 g, 4mmol, 4 eq.) innerhalb von 15 min zugetropft. Nach weiteren 15 min. versetzte man die nun dunkle Lösung mit Eis und 10 ml 0.5 M aq. Ba(OAc)<sub>2</sub>-Lösung (5 mmol, 5 eq.) und rührte 30 min. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und die Lösung mit dem doppelten Volumen von EtOH versetzt, wobei das Bariumsalz des 2',3'-Isopropyliden-guanosin-5'-O-monophosphorthioats ausfiel. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, zweimal mit EtOH und Aceton gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung der Schutzgruppe versetzte man 0.275 g des Feststoffs mit 20 ml 0.4 M aq. HCl und rührte 12 h bei RT. Man neutralisierte mit konz. aq. NH<sub>4</sub>OH und versetzte mit dem doppelten Volumen EtOH. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit EtOH und Aceton gewaschen. Der Feststoff wurde mit 0.21 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.5 mmol, 1.5 eq.) und 30 ml



Wasser versetzt und 1 h bei RT gerührt. Dabei fiel BaSO<sub>4</sub> aus, das sorgfältig abzentrifugiert wurde. Durch das Versetzen des Überstandes mit Aceton erhielt man 0.27 g (0.63 mmol, 63 %) des Na<sup>+</sup>-Salzes von **36** als amorphen Feststoff.

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35     R<sub>f</sub> = 0.47

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ = 4.02 (m, 2H, 5'-H), 4.31 (m, 1H, 4'-H), 4.48 (m, 1H, 3'-H), 4.77 (m, 1H, 2'-H), 5.88 (d, J=6.3 Hz, 1H, 1'-H), 8.22 (s, 1H, 8-H)

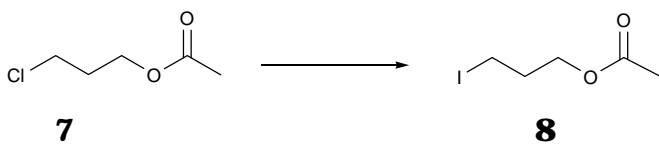
**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ = 44.05

**FT-IR (KBr):** 3422s, 1693s, 1608w, 1534m, 1482m, 1420w, 1364m, 1136s, 1019s, 864m, 800w, 780w, 691w, 620m

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>PS: 377.0  
gef.: 378.0

## 7.2.8 Synthese von Cy5-Phosphoramidit

### 7.2.8.1 Herstellung von 3-Iod-propyl-acetat **8**



In einem Rundkolben wurden unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre 6.2 ml 3-Chlor-propyl-acetat **7** (6.83 g, 50 mmol) in 100 ml trockenem Aceton gelöst und darin 22.48 g NaI (150 mmol, 3eq.) suspendiert. Man erhitze 4 h zum Rückfluss, wobei eine Gelbfärbung eintrat. Nach dem Abkühlen ließ man weitere 12 h bei RT rühren. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 100 ml Diethylether versetzt. Den Niederschlag filtrierte man ab und wusch sorgfältig mit Diethylether nach. Die vereinigten Etherfraktionen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Man erhielt 11.42 g der Verbindung **8** in Form eines gelblichen Öls (47.2 mmol, 94%).

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.02-2.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.30 (m, 2H, I-CH<sub>2</sub>), 4.03 (t, J=6.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>)

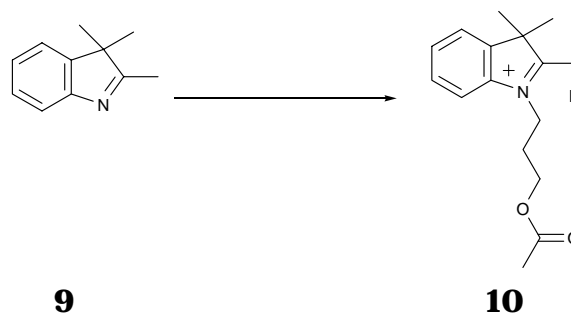
**FT-IR (KBr):** 3461w, 2960s, 2898w, 1862w, 1741s, 1466w, 1429m, 1385m, 1365s, 1232s, 1185s, 1139w, 1084w, 1047s, 983w, 940w, 886w, 833w, 814w, 752w, 633w, 604w

**EA:** C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>IO<sub>2</sub> Mr = 228.03

ber.: C 26.34 H 3.98

gef.: C 26.58 H 4.06

#### 7.2.8.2 Alkylierung von 2,3,3-Trimethylindolenin zu 1((3'(1'-Acetoxypropyl))-2,3,3-trimethyl-(3*H*)-indolinium Iodid 10



Unter Argon erhitze man 6.84 g 3-Iod-propyl-acetat **8** und 5.24 ml des Indolenins **9** unter starkem Rühren auf 50°C. Dann erhöhte man die Temperatur auf 100°C und ließ 3 h rühren. Die nun gummiartige Masse nahm man in 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1 auf, fällte das Produkt mit etwa 100 ml Diethylether aus und bewahrte den Kolben verschlossen über Nacht bei 4°C auf. Der Überstand wurde so vollständig wie möglich abdekantiert und der Feststoff getrocknet. Durch Umkristallisieren aus MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> erhielt man 10.24 g des rötlichen Salzes **10** (26.4 mmol, 88%).

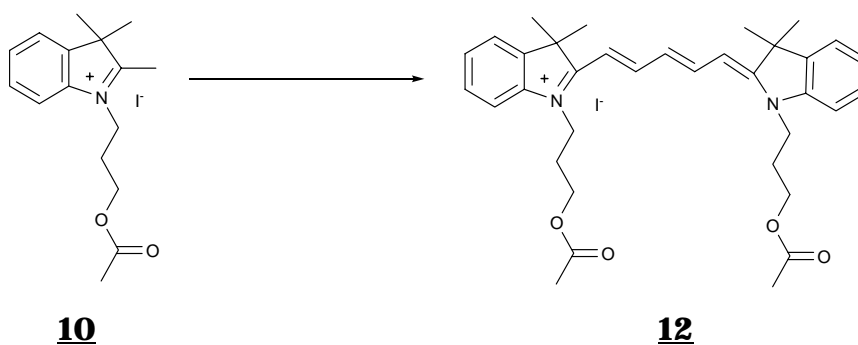
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 19:1

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 1.55 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.89 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.22 (t, J=6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.15 (t, J=6.3 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 4.56 (t, J=7.22 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 6.61-6.65 (m, 2H, Arom. H), 7.84 (m, 1H, Arom. H), 7.94-7.98 (m, 1H, Arom. H)

**FT-IR (KBr):** 3421w, 3078w, 3031w, 2970m, 2913w, 2419w, 2142w, 1993m, 1946m, 1826w, 1719s, 1654w, 1622m, 1592m, 1560w, 1541w, 1508w, 1482m, 1642sw, 1443s, 1404m, 1372s, 1331m, 1291m, 1251s, 1224m, 1169m, 1124m, 1052s, 986m, 953m, 934m, 865s, 812m, 766s, 661w, 645m, 602s

<b>EA:</b>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> INO <sub>2</sub>	Mr = 387.26	
ber.:	C 49.62	H 5.73	N 3.62
gef.:	C 49.51	H 5.55	N 3.56

### 7.2.8.3 Synthese von 1,1'-Bis-Acetoxypropyl-3,3',3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin Iodid 12



In 50 ml wasserfreiem Pyridin wurden unter Argon 7.74 g (20 mmol) der Verbindung **10** und 9.6 ml Malonaldehydtetraethylacetat (8.81 g, 40 mmol, 2 eq.) gelöst und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend engte man im Vakuum ein und reinigte den Rückstand mittels Flash-Chromatographie mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 19:1, später 9:1 auf. Man erhielt nach dem Trocknen 6.46 g (9.47 mmol, 94%) des blauen, metallisch glänzenden Farbstoffs **12**.

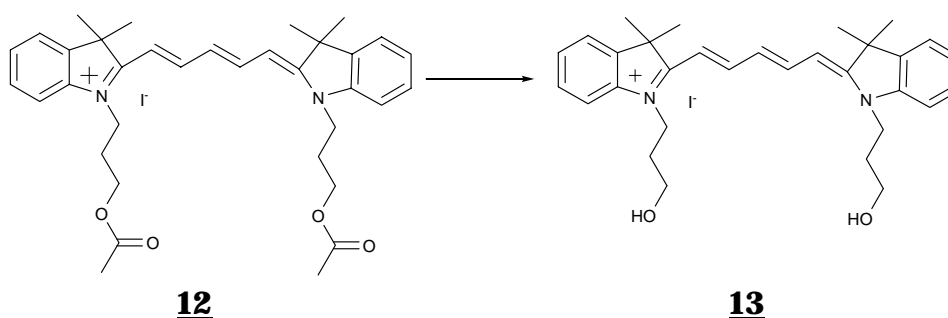
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH= 9:1      R<sub>f</sub> = 0.33

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 1.69 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 1.94 (s, 6H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.04 (t, J=6.3Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.06 (t, J=6.3 Hz, 4H, N-CH<sub>2</sub>), 4.21 (t, J=6.3 Hz, 4H, O-CH<sub>2</sub>), 6.31 (d, J=13.8 Hz, 2H, α-CH=), 6.55 (t, J=12.3 Hz, 1H, γ-CH=), 7.22-7.28 (m, 2H, Arom. H), 7.37-7.42 (m, 4H, Arom. H), 7.63 (d, J=7.22, 2H, Arom. H), 8.36 (t, J=12.9 Hz, 2H, β-CH=)

**FT-IR (KBr):** 3422w, 3964w, 1734s, 1676w, 1654w, 1617w, 1576m, 1494s, 1456s, 1382s, 1335s, 1239m, 1216s, 1148s, 1098s, 1043s, 1016s, 924s, 797s, 751m, 708s, 632w, 604w

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 555.3  
gef.: 555.2

#### 7.2.8.4 Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen zu 1,1'-Bis-(3''-(1''-hydroxypropyl))-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin 13



Zu 3.41 g des Polymethinfarbstoffs 12 (5 mmol) in 75 ml MeOH gab man 5.6 ml einer 5.4 M Lösung von NaOMe in MeOH (30 mmol, 6 eq.), wobei sich die anfangs blaue Lösung grün färbte. Nach 5 min. Rühren neutralisierte man die Lösung durch die Zugabe von Ionentauscher (Dowex 50 X 8, H<sup>+</sup>-Form). Die Lösung war neutral, als sie wieder die ursprüngliche blaue Farbe angenommen hatte. Der Ionentauscher wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 2.86 g des blauen Produktes 13 (4.8 mmol, 96%).

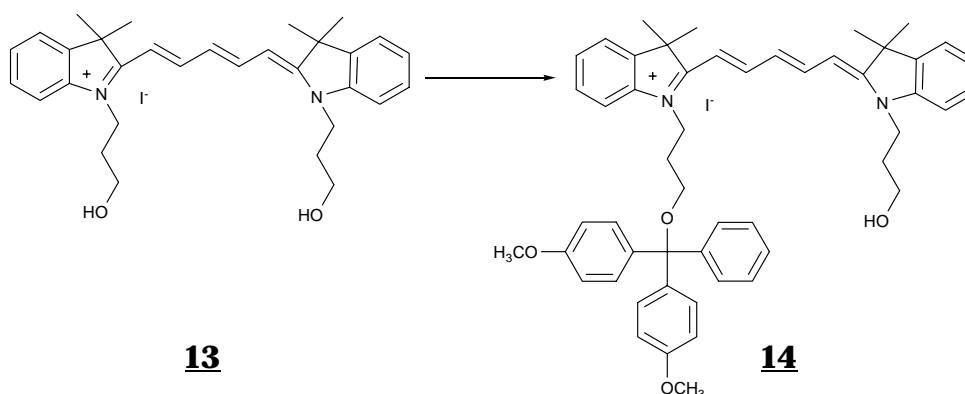
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1 R<sub>f</sub> = 0.16

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** = 1.68 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 1.85 (t, J=6.6 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.50 (t, J=6.0 Hz, 4H, N-CH<sub>2</sub>), 4.14 (t, J=6.7 Hz, 4H, O-CH<sub>2</sub>), 6.33 (d, J=13.8 Hz, 2H, α-CH=), 6.55 (t, J=12.4 Hz, 1H, γ-CH=), 7.20-7.29 (m, 2H, Arom. H), 7.34-7.45 (m, 4H, Arom. H), 7.63 (d, 2H, 7.1 Hz, Arom. H), 8.33 (t, J=13 Hz, 2H, β-CH=)

**FT-IR (KBr):** 3374m, 2964w, 2926w, 2868w, 1576m, 1560w, 1493s, 1452s, 1377s, 1335s, 1215w, 1198w, 1140s, 1113m, 1089m, 1041m, 1018m, 920s, 798s, 754s, 709s

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 471.3  
 gef.: 471.3

**7.2.8.5 Tritylierung zu 1-(3'''-(1'''Hydroxypropyl))-1'-(3''-(1''-dimethoxytriphenylmethyl)-oxypropyl))-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin Iodid 14**



In 40 ml trockenem Pyridin wurden 2.4 g des Farbstoffes **13** (4 mmol) gelöst, 1.36 g DMT-Cl (4 mmol, 1 eq.) und 50 mg DMAP (0.8 mmol, 0.2 eq.) zugefügt. Man ließ 12 h bei RT rühren. Die Lösung wurde mit 15 ml MeOH versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach nur unvollständiger Umsetzung erfolgte eine säulenchromatographische Trennung mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 19:1 über 9:1 bis 3:1. Man erhielt 1.5 g (1.67 mmol, 42%) des tritylierten Produkts **14** und 0.74 g (1.24 mmol, 31%) des Edukts **13** als blaue Feststoffe.

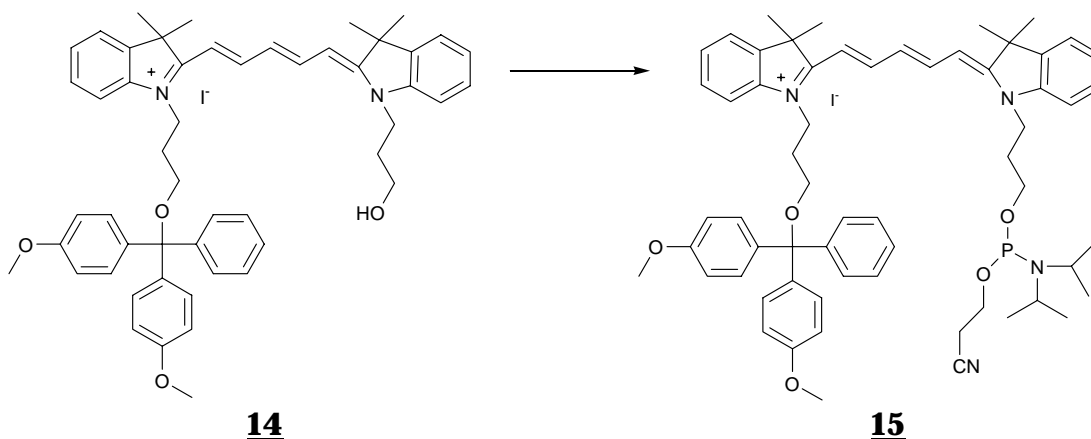
**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1      R<sub>f</sub> = 0.37

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 1.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.87 (t, J=6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.09 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.93 (t, J=5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-ODMT), 3.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-OH), 3.69, 3.71 (2s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.08-4.28 (m, 4H, 2N-CH<sub>2</sub>), 6.00-6.29 (m, 3H, CH=), 6.77-7.67 (m, 21H, Arom. H), 8.20-8.39 (m, 2H, CH=)

**FT-IR (KBr):** 3375w, 3050w, 3927w, 2868w, 1601m, 1577m, 1490s, 1452s, 1377s, 1333s, 1301w, 1248m, 1216m, 1144s, 1090w, 1062w, 1017w, 921s, 828m, 798m, 752m, 726w, 708m, 618w, 582w

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>52</sub>H<sub>57</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 773.4  
 gef.: 773.7

#### 7.2.8.6 Herstellung des Cy5-Phosphoramidits **15**



In 6 ml abs. THF löste man 506.6 mg der Verbindung **14**. Dazu gab man bei RT unter starkem Rühren 0.17 ml frisch destillierte Hünig-Base (0.13 g, 2 mmol, 4 eq.), gefolgt von 0.15 ml 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphorimidochloridit (0.14 g, 0.6 mmol, 1.2 eq.). Nach 1 h hydrolysierte man mit 1 ml gesättigter aq. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, überführte die Reaktionsmischung mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in einen Scheidetrichter und wusch die organische Phase dreimal mit Wasser. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in wenig CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und in 0°C kaltes n-Hexan getropft. Es bildete sich ein Niederschlag, der abfiltriert und mit n-Hexan gewaschen wurde. Man erhielt so eine Rohausbeute von 0.43 g an **15** (0.39 mmol, 78%).

**DC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 9:1 R<sub>f</sub> = 0.29

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** 1.21 (m, 12H, Isopropyl-H), 1.53, 1.70 (2s, 12H, CH<sub>3</sub>), 2.08 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.74 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 2.94 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-ODMT), 3.70, 3.73 (2s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.55-3.95 (m, 6H, N-CH<sub>2</sub>, Isopropyl-CH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 4.22 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>), 6.07 (m, 1H, CH=),

6.20 (t, 1H, CH=), 6.81 (d, 2H, Arom. H), 7.15-7.66 (m, 18H, Arom. H),  
8.25 (m, 2H, CH=)

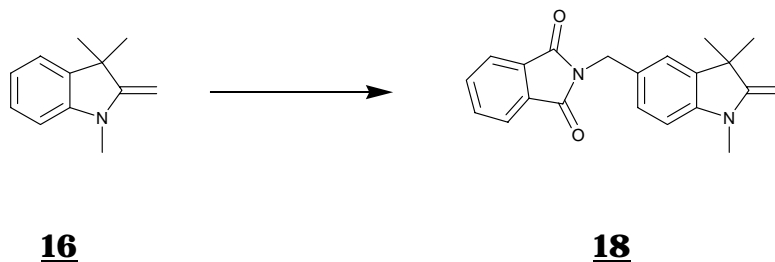
**$^{31}\text{P}$ -NMR (400 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta = 147.71$

**FT-IR (KBr):** 3447w, 2966m, 1607m, 1578w, 1508w, 1490s, 1456s, 1381m,  
1334m, 1302w, 1249m, 1216m, 1146s, 1091m, 1065w, 1045w, 1018w,  
1000w, 925m, 829m, 799m, 754m, 709m

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für  $\text{C}_{61}\text{H}_{74}\text{IN}_4\text{O}_5\text{P}^+$ : 973.5  
gef.: 973.9

## 7.2.9 Synthese von Cy5-Iodacetamid

### 7.2.9.1 Synthese von 1,3,3-Trimethyl-2-methylen-5-N-phthalimidometylindolin 18



Zu einer Lösung von 17.33 g Fischer-Base 16 (100 mmol) in 90 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gab man portionsweise bei RT 17.72 g N-Hydroxymethylphthalimid (100 mmol, 1 eq.) und ließ 70 h rühren. Die Lösung wurde auf Eis gegeben und mit konz.  $\text{NH}_4\text{OH}$  neutralisiert. Der ausgefallene rötliche Feststoff wurde mit Diethylether versetzt, wobei ein Teil in Lösung ging. Der Rückstand, bestand aus dem gewünschten Regioisomer. Er wurde aus  $\text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  umkristallisiert. Man erhielt 19.83 g (59.7 mmol, 60 %) des gelben Feststoffs 18, der sich an Luft rot verfärbte.

**DC:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$   $R_f = 0.44$

**$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta = 1.25$  (s, 6H, 2  $\text{CH}_3$ ), 2.98 (s, 3H, N- $\text{CH}_3$ ),  
3.85 (s, 2H,  $\text{C}=\text{CH}_2$ ), 4.67 (m, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 5.76 (s, 0.1 x  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 6.60 (d,

$J=8.0$  Hz, 1H, Arom. H), 7.06 (dd,  $J=1.5$  Hz, 8.2 Hz, 1H, Arom. H), 7.13 (d,  $J=1.6$  Hz, 1H, Arom. H), 7.83-7.92 (m, 4H, Phthalimid-H)

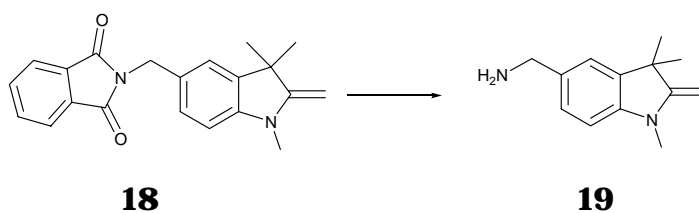
**FT-IR (KBr):** 3211s, 3035s, 1766m, 1714s, 1655m, 1615m, 1582w, 1499m, 1430s, 1394s, 1346m, 1324m, 1291w, 1279w, 1237w, 1099s, 940m, 907w, 813w, 792m, 760w, 726m, 707w, 616s

**EA:**  $C_{21}H_{22}N_2O_2$   $Mr = 332.40$

ber.:	C 75.88	H 6.06	N 8.43
ber. x 0.1 $CH_2Cl_2$ :	C 74.34	H 5.97	N 8.22
gef.:	C 74.22	H 6.20	N 8.50

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für  $C_{21}H_{22}N_2O_2$ : 332.2  
gef.: 332.9

#### 7.2.9.2 Darstellung von 5-Aminomethyl-1,3,3-trimethyl-2-methylen-5-N-phthalimidometylundolin **19**



16.62 g des Phthalimids **18** (50 mmol) wurden 10 h in 150 ml konz. aq. HCl zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde abgekühlt, die ausgefallene Phthalsäure abfiltriert und das Filtrat mit konz.  $NH_4OH$  neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum blieb ein oranges Öl zurück, was durch Kugelrohrdestillation gereinigt wurde. Man erhielt 9.71 g (48 mmol, 96 %) eines leicht gelblichen Öls **19**.

**DC:** i-PrOH/ $NH_3$ / $H_2O$  = 55:10:35  $R_f = 0.77$

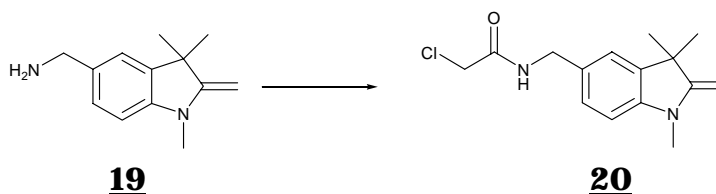
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz,  $d_6$ -DMSO):**  $\delta = 1.10$  (s, 6H, 2 $CH_3$ ), 2.99 (s, 3H, N- $CH_3$ ), 3.62 (s, 2H, C= $CH_2$ ), 3.83 (m, 2H, N- $CH_2$ ), 6.57 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H, Arom. H), 7.04 (m, 1H, Arom. H), 7.12 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H, Arom. H)



**FT-IR (KBr):** 3365w, 3292w, 3102w, 2960s, 2921s, 2860s, 1650s, 1615s, 1596w, 1496s, 1455m, 1378s, 1342s, 1303s, 1235s, 1182m, 1135s, 1064m, 945s, 885w, 804m, 766m, 685w

**EA:** C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub> Mr = 202.30  
 ber.: C 77.18 H 8.97 N 13.85  
 gef.: C 76.93 H 9.16 N 13.63

### 7.2.9.3 Umsetzung des Amins 19 zum 5-Chloracetamidomethyl-1,3,3-trimethyl-2-methylenindolenin 20



In 20 ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> löste man unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre 0.40 ml Chloressigsäurechlorid (0.57 g, 5 mmol, 1 eq.). Dazu wurden unter starkem Rühren bei 0°C eine Lösung von 1.01 g des Amins 19 (5 mmol) und 0.70 ml NEt<sub>3</sub> (0.51 g, 5 mmol, 1 eq.) in 100 ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> innerhalb von 30 min getropft. Nach 1.5 h Rühren bei RT nahm man die Lösung in 200 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf und extrahierte dreimal mit je 50 ml 1 N aq. HCl. Die wässrige Phase wurde mit aq. NaOH neutralisiert und anschließend mit Diethylether extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 1.07 g (3.85 mmol, 77 %) eines dunklen Öls 20.

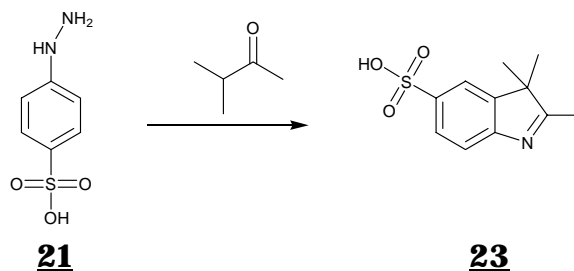
**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35 R<sub>f</sub> = 0.58

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):** δ = 1.23 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 3.00 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 2H, C=CH<sub>2</sub>), 4.09 (s, 2H, Cl-CH<sub>2</sub>), 4.21 (d, J=5.3 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 6.62 (d, J=8.2 Hz, 1H, Arom. H), 7.00–7.06 (m, 2H, Arom. H), 8.58 (br. s, 1H, N-H)

**FT-IR (KBr):** 3293m, 3066w, 2962w, 2926w, 1654s, 1618m, 1542m, 1498s, 1458w, 1380w, 1343w, 1304w, 1253m, 1182w, 1136m, 1067w, 1026w, 944m, 806m, 767m, 682w

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O: 278.1  
 gef.: 279.0

#### 7.2.9.4 Synthese von 2,3,3-Trimethyl-3*H*-indole-5-sulfonsäure **23**



In 60 ml Eisessig löste man 18.62 g p-Hydrazino-benzolsulfonsäure **21** (100 mmol) und 32.1 ml 3-Methyl-2-butanon (25.84 g, 300 mmol, 3 eq.) und erhitzte 3 h unter Rückfluss. Nach dem Kühlen auf 4°C bildete sich ein pinker Feststoff, der abfiltriert und getrocknet wurde. Nach dem Umkristallisieren aus EtOH/Diethylether erhielt man 21.3 g (89 mmol, 89 %) des rosa farbenen Produkts **23**.

**DC:** EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc = 16:4:4:1  $R_f = 0.58$

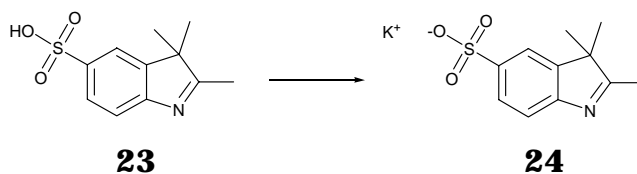
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 1.37 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.46 (d, J=7.8 Hz, 1H, Arom. H), 7.66 (dd, J=7.8 Hz, 1.6 Hz, 1H, Arom. H), 7.79 (s, 1H, Arom. H)

**FT-IR (KBr):** 3448m, 3125w, 3045w, 2977w, 2681w, 1718w, 1637m, 1573m, 1458s, 1418s, 1365w, 1283w, 1202s, 1122s, 1111w, 1064s, 1028s, 940w, 913w, 880m, 838w, 727s, 694s, 639s, 583w, 557w

**EA:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S  $Mr = 239.29$   
 ber.: C 55.21 H 5.48 N 5.85  
 gef.: C 50.92 H 5.95 N 5.57

**ESI<sup>+</sup>-MS:** ber. für C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S: 239.1  
 gef.: 239.9

### 7.2.9.5 Umsetzung zum Kalium-Salz des 2,3,3-Trimethyl-3*H*-indol-5-sulfonats **24**



In 50 ml MeOH wurden 11.97 g des Indols **23** (50 mmol) und gelöst. Bei 0°C wurde eine gesättigte Lösung von KOH in i-PrOH langsam zugetropft. Nach einiger Zeit schied sich ein gelber Feststoff ab, der abfiltriert und getrocknet wurde. Man erhielt 13.6 g (49 mmol, 98 %) des gelben Produkts **24**.

**DC:** EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc = 16:4:4:1  $R_f$  = 0.48

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 1.26 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.33 (s, 0.7 H<sub>2</sub>O), 7.35 (d,  $J$ =8.5 Hz, 1H, Arom. H), 7.57 (m, 1H, Arom. H), 7.64 (s, 1H, Arom. H)

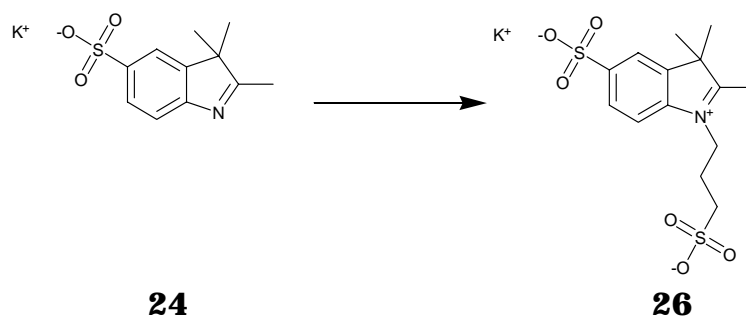
**FT-IR (KBr):** 3484s, 3067w, 2965s, 2929w, 2872w, 1654w, 1575s, 1459s, 1421m, 1386m, 1363w, 1286w, 1194s, 1120s, 1065s, 1032s, 940w, 906w, 880w, 839s, 771w, 728s, 659s, 643s

**EA:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>KNO<sub>3</sub>S  $Mr$  = 277.38

ber.:	C 47.63	H 4.36	N 5.05
ber. x 0.7 H <sub>2</sub> O:	C 45.56	H 4.66	N 4.83
gef.:	C 45.65	H 4.97	N 4.83

**ESI-MS:** ber. für C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>KNO<sub>3</sub>S<sup>-</sup>: 237.9  
gef.: 237.7

### 7.2.9.6 Alkylierung des Indols **24** zu 2,3,3-Trimethyl-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolinium-5-sulfonat Kalium Salz **26**



Unter Argon-Atmosphäre wurde eine Lösung von 2.77 g des Kaliumsalzes **24** (10 mmol) in 5 ml Dichlorbenzol mit 1.32 ml 1,3-Propansulton (1.83 g, 15 mmol, 1.5 eq.) versetzt und 12 h auf 120°C erhitzt. Nach dem Abkühlen dekantierte man das Dichlorbenzol ab und wusch den Rückstand sorgfältig mit Diethylether nach. Man erhielt 3.4 g (8.5 mmol, 85 %) von **26** in Form eines roten Pulvers.

**DC:** EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc = 16:4:4:1  $R_f = 0.09$

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 1.56 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 2.17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), 2.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.33 (s, 1 x H<sub>2</sub>O), 4.65 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 7.81-8.02 (m, 3H, Arom. H)

**FT-IR (KBr):** 3454s, 2935w, 1654w, 1637w, 1625w, 1560w, 1508w, 1474m, 1420w, 1369w, 1340w, 1202s, 1120m, 1034s, 640w, 836w, 791w, 732w, 696w, 655w, 622w, 597w

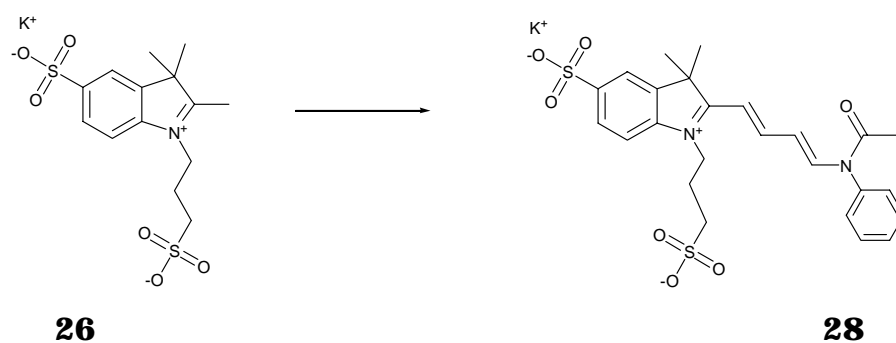
**EA:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>KNO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>  $Mr = 399.53$

ber.:	C 42.09	H 4.54	N 3.51
ber. x 1 H <sub>2</sub> O:	C 40.27	H 4.83	N 3.35
gef.:	C 40.01	H 5.09	N 3.36

**ESI-MS:** ber. für C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>KNO<sub>6</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>: 359.9

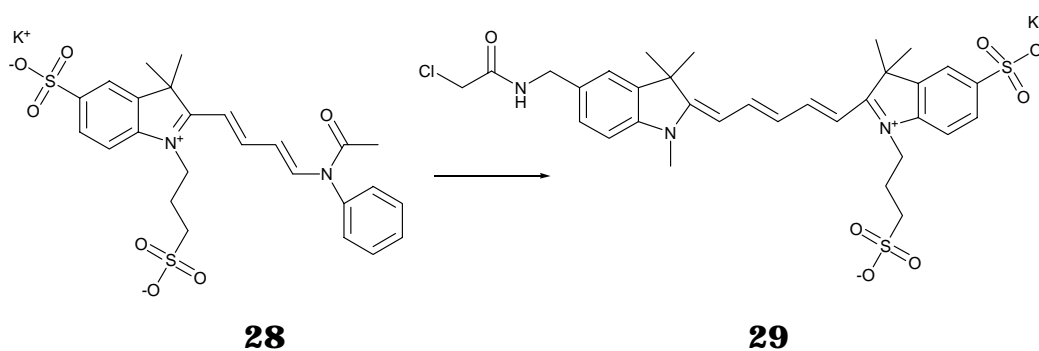
gef.: 360.0

**7.2.9.7 Umsetzung mit Malonaldehyd-Dianilid zu 2-[(1E,3E,)- $\alpha$ -Acetylphenylaminobuta-1,3-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium-5-sulfonat 28**



In 10 ml einer Lösung von Eisessig und Essigsäureanhydrid im Verhältnis 1:2 suspendierte man 2 g des quartären Amins **26** (5 mmol, 2 eq.) und 0.65 g Malonaldehyd-Dianilid Monohydrochlorid (2.5 mmol) und erhitze 2 h auf 120°C. Man erhielt eine dunkle Lösung von **28**, die ohne Aufarbeitung weiter umgesetzt wurde.

**7.2.9.8 Synthese des 2-[(1E,3E, 5E)-5-(5-(Chloroacetylamino)-1,3,3-trimethyl-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indolium-5-sulfonat Kalium Salz 29**



Die Lösung von **28** wurde mit 0.7 g (2.5 mmol) der Verbindung **20** gemischt und 30 min. auf 120°C erhitzt. Nach dem Abkühlen fällte man den blauen

Farbstoff durch die Zugabe von Diethylether aus. Das Rohprodukt wurde durch Flash-Chromatographie mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5:1 + 1\% \text{NEt}_3$  aufgereinigt. Es wurden 1.7 g (1.63 mmol, 65%) des Produktes **29** erhalten.

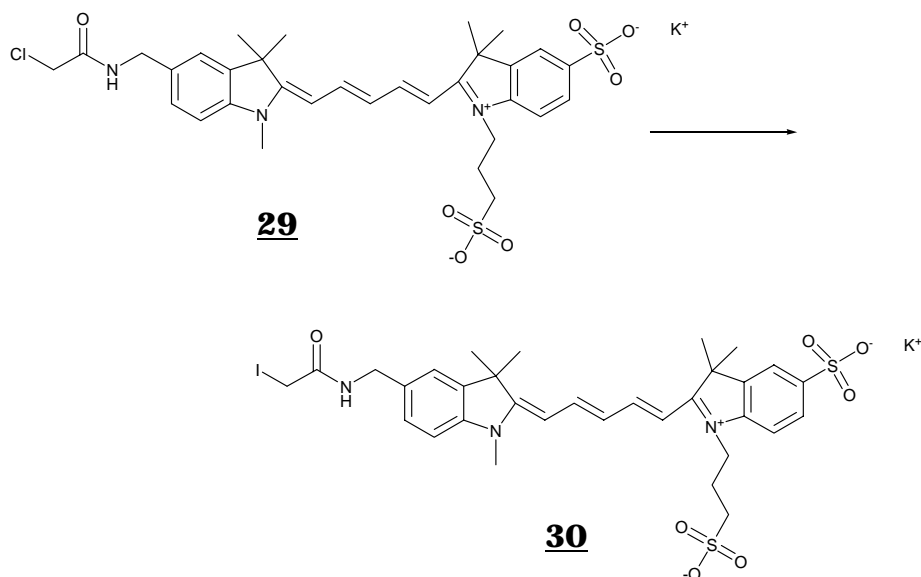
**DC:** i-PrOH/ $\text{NH}_3$ / $\text{H}_2\text{O}$  = 55:10:35  $R_f = 0.74$

**$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO):**  $\delta = 1.67$  (s, 12H, 4 $\text{CH}_3$ ), 1.99 (p,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.58 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{SO}_3$ ), 3.60 (s, 3H, N- $\text{CH}_3$ ), 4.13 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Cl}$ ), 4.25 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4.35 (d,  $J=5.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 6.28 (d,  $J=13.7$  Hz, 1H,  $\text{C=CH}$ ), 6.35-6.61 (m, 2H, Arom. H), 7.26-7.39 (m, 3H, Arom. H), 7.50 (s, 1H, Arom. H), 7.62 (dd,  $J=1.4$  Hz, 8.2 Hz, 1H,  $\text{C=CH}$ ), 7.79 (d,  $J=1.4$  Hz, 1H,  $\text{C=CH}$ ), 8.34 (t,  $J=12.9$  Hz, 2H,  $\text{C=CH}$ ), 8.74 (t, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3423m, 2926w, 2346w, 1670w, 1654w, 1577w, 1506s, 1472s, 1372s, 1331s, 1218m, 1182s, 1152s, 1102s, 1021s, 929m, 847w, 813m, 744w, 719w, 696m, 622m

**ESI-MS:** ber. für  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{ClN}_3\text{O}_7\text{S}_2^-$ : 674.0  
gef.: 674.4

**7.2.9.9 Umsetzung zum 2-[(1E,3E, 5E)-5-(5-(Iodoacetyl-amino)-1,3,3-trimethyl-1,3-dihydro-2H-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-1-(3-sulfonatopropyl)-3H-indolium-5-sulfonat 30**



0.71 g des Farbstoffs **29** (1 mmol) wurden 3 h in einer Lösung aus 1.5 g NaI (10 mmol, 10 eq.) in 30 ml MeOH zum Rückfluss erhitzt. Dann engte man die Lösung auf 10 ml ein. Durch die Zugabe von 100 ml Aceton fällte man das Produkt aus. Man erhielt 0.63 g (0.78 mmol, 78 %) des blauen Produktes **30**.

**DC:** i-PrOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O = 55:10:35  $R_f$  = 0.71

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):**  $\delta$  = 1.67 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub>), 1.99 (p, J=7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.58 (t, J=6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), 3.60 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-I), 4.25 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 4.35 (d, J=5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 6.28 (d, J=13.7 Hz, 1H, C=CH), 6.35-6.61 (m, 2H, Arom. H), 7.26-7.39 (m, 3H, Arom. H), 7.50 (s, 1H, Arom. H), 7.62 (dd, J=1.4 Hz, 8.2 Hz, 1H, C=CH), 7.79 (d, J=1.4 Hz, 1H, C=CH), 8.34 (t, J=12.9 Hz, 2H, C=CH), 8.74 (t, 1H, NH)

**FT-IR (KBr):** 3424s, 2968w, 2367w, 1702w, 1654m, 1576w, 1506s, 1472s, 1374s, 1330s, 1218m, 1182s, 1152s, 1106s, 1024s, 930m, 849w, 815m, 743m, 720w, 698m, 623m

**ESI-MS:** ber. für C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>: 766.1





Lösung von 28.33 g (280 mmol) N,N-Diisopropylamin in 40 ml abs. THF. Es wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der farblose Feststoff abgesaugt und die erhaltene klare Lösung im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum destilliert. Man erhielt 20.35 g (86 mmol, 61%) einer klaren farblosen Flüssigkeit **104**, die bei -18°C gelagert wurde.

**Sdp.:** 103-108°C, 10<sup>-1</sup> mbar      Lit. [83]: 103-104°C, 10<sup>-1</sup> mbar

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 1.14 (m, 12H, 4CH<sub>3</sub>), 2.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CN), 3.73-3.78 (m, 2H, N-CH), 4.00 (dt, J=6.1 Hz, J=7.7 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>)

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 180.46

## 7.3 Oligonucleotidsynthese

### 7.3.1 Festphasensynthese

Zur Herstellung der Oligonucleotide wurde mit Hilfe des DNA-/RNA-Synthesizers *Applied Biosystems ABI 381A* eine chemische Festphasensynthese durchgeführt. Für die DNA Synthesen wurde ein Standard Synthesezyklus des Gerätes verwendet. Der vorgegebene Synthesezyklus für die RNA-Synthese hingegen wurde verändert, um eine größere Reinheit und Ausbeute der Oligonucleotide zu erreichen. Dazu wurden u.a. die Kupplungszeiten erhöht und die Amiditzulieferung pro Kupplungsschritt mehrmals durchgeführt (Schritt 6-9 in Tabelle 4). Die Synthesesäulen (DNA oder RNA) im Maßstab von 1.0  $\mu\text{mol}$  und DNA-Amidite ( $\text{dA}^{\text{Bz}}$ ,  $\text{dC}^{\text{Ac}}$ ,  $\text{dC}^{\text{Bz}}$ ,  $\text{dG}^{\text{dam}}$  und  $\text{dT}$ ) wurden von *Perseptive* oder *Glen Research* bezogen. Die Synthesereagenzien wurden teilweise selbst hergestellt. Die Tetrazol-Lösung und die Waschflüssigkeit ( $\text{MeCN}$ ,  $\text{H}_2\text{O} < 10 \text{ ppm}$ ) wurden von *Roth* bezogen. Bei RNA-Synthesen wurde der standardmäßig verwendete Aktivator Tetrazol durch 4,5-Dicyanimidazol ersetzt. Die Reagenzien wurden nach der folgenden Vorschrift hergestellt:

Capping Reagenz A:	5.0 ml $\text{Ac}_2\text{O}$ in 40 ml abs. THF
Capping Reagenz B:	4.5 ml Pyridin, 9.0 ml 1-Methylimidazol in 32 ml abs. THF
Oxidationslösung:	2.54 g Iod, 20 ml Pyridin, 10 ml Wasser, 70 ml dest. THF
Detritylierungsreagenz:	30 g TCA in 1.0 l abs. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
Kupplungsreagenz:	0.25 M, 1.48 g 4,5-Dicyanimidazol in 50 ml abs. MeCN
Phosphoramidite:	0.1 M, bei den RNA-Amiditen kamen nur die selbst hergestellten Verbindungen zum Einsatz. Das Cy5-Phosphoramidit wurde von <i>Pharmacia</i> oder <i>Glen Research</i> erworben

Die gesamte Menge der Phosphoramidite, die für einen Kupplungsschritt benötigt wurden, entsprachen einem 15-20 fachen Überschuss. Nach der Aufreinigung erhielt man eine Ausbeute von 0.4-0.7  $\mu\text{mol}$  bei DNA Oligomeren und 0.2-0.5  $\mu\text{mol}$  für die RNA Oligomere. In Tabelle 4 ist ein Synthesesyklus für *ABI 381A*-Synthesizer wieder gegeben.

Tabelle 4: Synthesesyklus für eine DNA- oder RNA Synthese, Kupplungszeiten RNA oder Farbstoffe: 600 sec, DNA: 100 sec. Schritt 42-47: spezieller Spülzyklus nur bei Kupplung mit Farbstoffen, um Kontamination des Gerätes zu vermeiden

Schritt	Funktion	Zeit [sec]
1	MeCN to waste	5
2	MeCN to column	60
3	reverse flush	5
4	block flush	5
5	phosphoramidite preparation	3
6	base + coupling reagent to column	10
7	wait	600/100
8	base + coupling reagent to column	8
9	wait	600/100
10	reverse flush	5
11	block flush	5
13	capping mix preparation	3
14	capping mix to column	22
15	MeCN to waste	5
16	block flush	5
17	MeCN to waste	5
18	reverse flush	5
19	block flush	5
20	iodine to waste	5
21	iodine to column	40
22	block flush	5
23	wait	20
24	MeCN to waste	5
25	reverse flush	10
26	block flush	5
27	MeCN to waste	5
28	MeCN to column	15
29	reverse flush	5
30	MeCN to column	15
31	reverse flush	5
32	MeCN to column	15
33	reverse flush	5
34	MeCN to column	15
35	reverse flush	5
36	block flush	5
37	cycle entry	1
38	MeCN to waste	5
39	MeCN to column	30
40	reverse flush	5
41	block flush	5
42	flush to port X	10
43	MeCN to port X	10
44	MeCN to waste	5
45	MeCN to column	30

46	reverse flush	5
47	block flush	5
48	advance fraction collector	1
49	waste port (collect trityl)	1
50	TCA to waste	5
51	TCA to column	120
52	block flush	5
53	MeCN to waste	5
54	MeCN to column	100
55	reverse flush	5
56	block flush	5
57	waste bottle	1
58	cycle end	1

### 7.3.2 Aufarbeitung der Oligonucleotide

Nach beendeter Synthese wird das Oligomer von der festen Phase abgespalten, wobei auch die Schutzgruppen an den Basen und an den Phosphaten entfernt werden. Das erfolgte unter basischen Bedingungen mit Hilfe der "Double-Syringe"-Methode (ABI-Userbulletin Nr. 53). Hierzu befestigte man die Synthes Säule zwischen zwei 2 ml Einwegspritzen und spülte mehrmals mit 1 ml einer Lösung aus  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25 %ig)/EtOH = 3:1. Nach 30 min. gab man diese Lösung in ein „Safe Lock“ Eppendorf Gefäß. Anschließend führte man dies noch zweimal mit je 0.5 ml der ammoniakalischen Lösung für je 15 min. durch. Die vereinigten Abspaltungslösungen wurden für 12 h bei 55°C inkubiert und das Lösungsmittel dann an der SpeedVac entfernt. Cy5-markierte Oligonucleotide wurden für 24 h bei RT inkubiert, da der Farbstoff empfindlich gegen zu starke basische Bedingungen ist. Bei Oligonucleotiden, die Diaminopurin enthielten, wurde die Abspaltung mit 2 ml AMA ( $\text{NH}_4\text{OH}$  (25 %ig)/Methylamin (40%) = 1:1 durchgeführt. Inkubiert wurde hier für 90 min. bei 70°C. Nach der Entschützung wurden die DNA/RNA-Proben durch eine Ethanol fällung entsalzt. Dazu wurden die trockenen Pellets in 50 µl einer 3.0 M aq. NaOAc-Lösung (pH 5.2) gelöst und mit 500 µl EtOH versetzt. Die Probe wurde gevortext und 1 h bei -18°C aufbewahrt. Anschließend zentrifugierte man 10 min. bei 18000 rpm und -10°C. Der Überstand wurde abdekantiert und die Probe an der SpeedVac getrocknet.

Da RNA-Oligonucleotide nach der basischen Entschützung noch Silylschutzgruppen trugen, mussten sie vor der Ethanol fällung noch desilyliert werden. Dazu wurde die RNA-Probe mit 100 µl einer frisch hergestellten

Mischung aus 100  $\mu\text{l}$  N-Methylpyrrolidinon, 75  $\mu\text{l}$  Triethylamin und 50  $\mu\text{l}$   $(\text{HF})_3\cdot\text{NEt}_3$ -Komplex (in dieser Reihenfolge mischen) versetzt und für 90 min. bei 65°C inkubiert. Zur Durchführung einer anschließenden Fällung gab man dazu 10  $\mu\text{l}$  einer 3.0 M aq. NaOAc-Lösung (pH 5.2) und versetzte mit 500  $\mu\text{l}$  n-Butanol. Die Lösung wurde 1 h bei -18°C gelagert und anschließend für 10 min. bei 18000 rpm und -10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Probe an der SpeedVac getrocknet.

Farbstoffmarkierte Oligonucleotide wurden noch über RP-18 Kartuschen (*Sep-Pak, Waters*) aufgereinigt. Dazu wurde die Kartusche an einer 10 ml Spritze befestigt und mit 10 ml abs. MeOH gespült. Dann wusch man zur Äquilibration mit 10 ml sterilem Wasser. Das trockene Pellet der Probe wurde in 1 ml sterilem Wasser gelöst und auf die Säule aufgetragen. Man wusch mit 10 ml sterilem Wasser, um die Salze zu entfernen. Die farbstoffmarkierten Oligomere wurden abschließend mit MeCN/Wasser = 4:6 eluiert.

DNA Oligomere wurden teilweise über Sephadex (*NAP-10* Säulen, *Pharmacia*) entsalzt. Die Säule wurde fünfmal mit je 5 ml sterilem Wasser gewaschen. Die in 1 ml Wasser gelöste Probe wurde auf die Säule aufgetragen und das Produkt mit Wasser eluiert. Es wurden Fraktionen von je 0.5 ml gesammelt und mittels UV-Absorption deren Produktanteil ermittelt.

### 7.3.3 Quantifizierung der Oligonucleotide

Zur Berechnung der Konzentration der Oligonucleotid-Lösungen wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz  $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ <sup>26</sup> verwendet. Die molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  der Oligonucleotide ergeben sich aus der Addition der molaren Extinktionskoeffizienten der Monomere von A = 15300, C = 7400, D = 7370, G = 11300 und U(T) = 9600. Die so erhaltene Summe wurde noch mit dem Korrekturfaktor für einzelsträngige DNA von 0.9 multipliziert.

---

<sup>26</sup> E bezeichnet die gemessene Extinktion, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Küvette.

Die aufgereinigte Probe wurde in 100  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst. Davon pipettierte man 1  $\mu\text{l}$  in eine Küvette mit 1000  $\mu\text{l}$  Wasser. Von dieser Lösung wurde dann die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt und mit dem Verdünnungsfaktor von 1000 multipliziert. Diesen Wert dividierte man durch den molaren Extinktionskoeffizienten und erhielt so die Konzentration in mol/l. Zur Herstellung der 1.0 mM Stammlösungen der Oligonucleotide ergänzte man das entsprechende Volumen mit sterilem Wasser.

### 7.3.4 Reinheitskontrolle der Oligonucleotide

Die Reinheit der per Festphasensynthese hergestellten und aufgereinigten Oligonucleotide wurden mittels analytischer HPLC bestimmt. Dazu verdünnte man 1  $\mu\text{l}$  der 1.0 mM Stammlösung mit 10  $\mu\text{l}$  Wasser. Mit einer reversed phase HPLC-Säule (*Bischoff Prontosil 120-5-C18 H*, 5  $\mu\text{m}$ ) wurde diese Probe aufgetrennt und per Integration der Produktanteil bestimmt. Als Laufbedingungen für die nichtmarkierten Oligonucleotide wählte man einen linearen Gradienten mit Puffer B (MeCN) von 5-20% in Puffer A (0.05 M aq. TEAA pH 6.5) in 20 min. Die Flussrate betrug 0.8 ml/min. Die UV-Detektion wurde bei  $\lambda = 260$  nm durchgeführt.

Oligomere mit Cy5-Markierung wurden durch einen linearen Gradienten mit Puffer B von 10-25% in Puffer A in 20 min. analysiert. Die Flussrate betrug auch hier 0.8 ml/min. Die UV-Detektion erfolgte bei  $\lambda = 260$  nm und die Fluoreszenz-Detektion bei einer Anregung von  $\lambda_{\text{ex}} = 643$  nm und einer Emission von  $\lambda_{\text{em}} = 667$  nm. Als Reinheit lies sich so stets ein Wert von über 90% ermitteln. Eine weitere Aufreinigung war deshalb nicht nötig.

### 7.3.5 Liste der verwendeten Oligonucleotide

Primer 1: Acr-d(A-A)-rA<sup>3'</sup>  
Primer 2: Acr-d(A-A-A.-(2',5'))-rA<sup>3'</sup>  
Primer 3: Acr-d(A-A)-rA.-(3',5')-rA<sup>3'</sup>  
Primer 4: Acr-(2',5')-r(A-A-A)<sup>3'</sup>  
Primer 5: Acr-(2',5')-r(A-A-A.-A)<sup>3'</sup>  
Primer 6: Acr-d(G-C-A.-C)-rG-(2',5')-d(A.-C-T)<sup>3'</sup>

---

Primer 7:	Acr-d(G-C-A.-C)-rG-3'-Phosphat
Primer 8:	Acr-d(G-C-A.-C)-rG-2',3'-cyclo-Phosphat
Primer 9:	Acr-d(G-C-A.-C)-rG-dT <sup>3'</sup>
Primer 10:	Cy5-(dT) <sub>4</sub> -r(G-C-A.-C-G-(3',5')-A.-C-U) <sup>3'</sup>
Primer 11:	Cy5-(dT) <sub>4</sub> -r(G-C-A.-C-G-(2',5')-A.-C-U) <sup>3'</sup>
Primer 12:	Cy5-(dT) <sub>16</sub> -r(C-C-C.-C-C-C) <sup>3'</sup>
Primer 13:	Cy5-(dT) <sub>4</sub> -r(C-C-G.-C-C) <sup>3'</sup>
Primer 14:	Cy5-(dT) <sub>21</sub> -r(C-C-A.-C-G-C.-A-C-G) <sup>3'</sup>
Primer 15:	Cy5-(dT) <sub>6</sub> -r(C-U-C.-C-C-U.-U-C-C) <sup>3'</sup>
Primer 16:	Cy5-(dT) <sub>21</sub> -r(C-C-U.-C-U-C.-C-C-C) <sup>3'</sup>
Primer 17:	Cy5-(dT) <sub>21</sub> -r(C-C-C-C-C-G) <sup>3'</sup>
Primer 18:	Cy5-(dC) <sub>6</sub> -(rA) <sub>5</sub> -(3',5')-rA-(rA) <sub>6</sub> <sup>3'</sup>
Primer 19:	Cy5-(dC) <sub>6</sub> -(rA) <sub>5</sub> -(2',5')-rA-(rA) <sub>6</sub> <sup>3'</sup>
Primer 20:	Cy5-(dT) <sub>21</sub> -d(G-C-A-C)-rG <sup>3'</sup>
Primer 21:	Cy5-(dT) <sub>3</sub> -r(C-C-U-U-C-C) <sup>3'</sup>
Primer 22:	Cy5-(dT) <sub>24</sub> -r(C-C-C-C-C-C) <sup>3'</sup>
Primer 23:	Cy5-(dT) <sub>16</sub> -d(C-C-C-C-C)-rC <sup>3'</sup>
Primer 24:	Cy5-(dT) <sub>9</sub> -d(G-C-A.-C-G-G.-C-A-C.-G-G-C.-A-C)-rG <sup>3'</sup>
Primer 25:	Cy5-(dT) <sub>9</sub> -r(G-C-A.-C-G-G.-C-A-C.-G-G-C.-A-C-G) <sup>3'</sup>
Templat 1:	3'd(T-T-T.-T-T-T.-T-T) <sup>5'</sup>
Templat 2:	3'd(T-T-T.-T-T-T.-T-T-T.-T-T-T) <sup>5'</sup>
Templat 3:	3'd(T-T-T.-T-T-T.-T-T-T.-T-T-T.-T-T-T) <sup>5'</sup>
Templat 4:	3'(2',5')-d(U-U-U.-U-U-U.-U-U-U.-U-U-U) <sup>5'</sup>
Templat 5:	3'(3',5')-d(U-U-U.-U-U-U.-U-U-U.-U-U-U) <sup>5'</sup>
Templat 6:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-G-A.-G-C-C.-C-G) <sup>5'</sup>
Templat 7:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-C.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 8:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-C.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 9:	3'd(G-G-G.-G-G-G.-C-C-T.-T-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 10:	3'd(G-G-G.-G-G-G.-C-T-C.-C-T-C.-C) <sup>5'</sup>
Templat 11:	3'd(G-G-G.-G-G-G.-C-C-C.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 12:	3'd(G-G-C.-G-G-C.-C-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 13:	3'd(G-G-C.-G-G-C.-C-T-T.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 14:	3'd(G-G-C.-G-G-C.-C-C-C.T-C) <sup>5'</sup>
Templat 15:	3'd(G-G-G.-G-G-G.-C-C-G.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 17:	3'd(G-G-C.-G-G-C.-C-C-C.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 18:	3'd(G-G-A.-A-G-G.-C-C-C.-C-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 19:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-T.-C-C-T.-C-C-T.-C) <sup>5'</sup>
Templat 20:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-T.-C-C-T.-C-C-T.-C-C-T) <sup>5'</sup>
Templat 21:	3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-C-T.-T-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 22:	3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-C-C.-T-T-C.-C) <sup>5'</sup>
Templat 23:	3'd(G-G-G.-G-G-C.-T-C-C.-T-T-C.-C) <sup>5'</sup>
Templat 24:	3'-d(G-G-G.-G-G-C.-C-C-C.-C) <sup>5'</sup>
Templat 25:	3'd(G-G-G.-G-G-C.-[C/T]-C-C.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 26:	3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-[C/T].-C-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 27:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-[C/T]-C-C.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 28:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-C.-C-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 29:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C) <sup>5'</sup>
Templat 30:	3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C) <sup>5'</sup>

- Templat 31: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C)5'
- Templat 32: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-T.-T-C-C)5'
- Templat 33: 3'd(G-G-A.-G-G-G.-C-C-T.-T-C-C)5'
- Templat 34: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-C-G.-C-C-C)5'
- Templat 35: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-G-C.-C-C-C)5'
- Templat 36: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-G-T-C.-C-C-C)5'
- Templat 37: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-G-C-T.-C-C-C)5'
- Templat 38: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-A-G-C.-C-C)5'
- Templat 39: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-A-T-C.-C-C)5'
- Templat 40: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-G-A.-G-C-C.-G)5'
- Templat 41: 3'd(G-C-G.-T-G-C).-rD-d(C-C.-C-C-C)5'
- Templat 42: 3'd(G-G-A.-A-G-G.-G-C-A.-C-G-C)5'
- Templat 43: 3'd(G-A-G.-G-G-G.-G-C-A.-C-G-C)5'
- Templat 44: 3'd(G-A-G.-G-G-G.-C-C-T.-T-C-C.-C-T-C)5'
- Templat 45: 3'd(G-A-G.-G-G-A.-A-G-G.-C-C-C.-C-T-C.-T-C-C)5'
- Templat 46: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-G-C-C.-C-C)5'
- Templat 47: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-G-C.-C-C)5'
- Templat 48: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-G-G-G.-G)5'
- Templat 49: 3'd(G-G-A.-G-A-G.-G-G-G.-C-C-T.-T-C-C.-C-T-C)5'
- Templat 50: 3'd(G-G-A.-A-G-G.-C-C-C.-C-T-C)5'
- Templat 51: 3'd(G-A-G.-G-G-G.-C-C-T.-T-C-C)5'
- Templat 52: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-[C/T]-C.-C-C)5'
- Templat 53: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-[C/T]-[C/T].-C-C-C)5'
- Templat 54: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-[A/C/G/T]-C.-C-C)5'
- Templat 55: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-T.-C-C-T.-C-C-T.-C-C)5'
- Templat 56: 3'r(G-C-G.-T-G-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C)5'
- Templat 57: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T].-C-C-C)5'
- Templat 58: 3'd(G-G-G.-G-G-G.-G-C-A.-C-G-C)5'
- Templat 59: 3'd(G-A-G.-G-G-G.-G-C-A.-C-G-C)5'
- Templat 60: 3'd(G-A-G.-G-G-G.-C-C-C.-C-C-C)5'
- Templat 61: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-G-G-G.-G-G-G)5'
- Templat 62: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-G-G-G.-G-G-G.-G-G)5'
- Templat 63: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-G-G-G.-G-G-G.-G-G.-G)5'
- Templat 64: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-G-G-G.-G-G-G.-G-G-G.-G-G-G)5'
- Templat 65: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-[C/T]-[C/T].-[C/T]-C-C-C)5'
- Templat 66: 3'd(G-G-A.-A-G-G.-[C/T]-C-C.-C-C-C.-C)5'
- Templat 67: 3'd(G-G-A.-A-G-G.-[C/T]-[C/T]-C.-C-C-C.-C-C)5'
- Templat 68: 3'd(G-G-G.-G-G-G.-[C/T]-C-C.-T-T-C.-C)5'
- Templat 69: 3'd(G-G-G.-G-G-G.-[C/T]-[C/T]-C.C-T-T.-C-C)5'
- Templat 70: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T].-[A/C/G/T]-C)5'
- Templat 71: 3'd(G-G-A.-A-G-G.-[A/C/G/T]-C-C.-C-C-C.-C)5'
- Templat 72: 3'd(G-G-A.-A-G-G.-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-C.-C-C-C.-C-C)5'
- Templat 73: 3'-d(G-G-G.-G-G-G.-[A/C/G/T]-C-C.-T-T-C.-C)5'
- Templat 74: 3'd(G-G-G.-G-G-G.-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-C.C-T-T.-C-C)5'
- Templat 75: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G.-C)5'
- Templat 76: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G)5'
- Templat 77: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G.-C-C)5'
- Templat 78: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T])5'



- Templat 79: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T].-[A/C/G/T])<sup>5'</sup>
- Templat 80: 3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-C-C.-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 81: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-T-T.-T-T-T)<sup>5'</sup>
- Templat 82: 3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 83: 3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C.-C)<sup>5'</sup>
- Templat 84: 3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C.-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 85: 3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-[C/T]-[C/T].-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 86: 3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-[A/C/G/T]-C.-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 87: 3'd(G-G-G.-G-G-C.-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T].-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 88: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-D-D-D.-D-D-D)<sup>5'</sup>
- Templat 89: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-D-C-C.-C)<sup>5'</sup>
- Templat 90: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-D-D-C.-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 91: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-C-C.-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 92: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-T-C.-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 93: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-T-T.-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 94: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-T-T-T.-T)<sup>5'</sup>
- Templat 95: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-A-C-C.-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 96: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-A-A-C.-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 97: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-A-A-A.-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 98: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-A-A-A.-A)<sup>5'</sup>
- Templat 99: 3'd(G-C-G.-T-G-C.-).r(D-D)-d(C.-C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 100: 3'd(G-C-G.-T-G-C)-.r(D-D-D.-)-d(C-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 101: 3'd(G-C-G.-T-G-C)-.r(D-D-D.-D)<sup>5'</sup>
- Templat 102: 3'r(G-C-G.-U-G-C.-U-C-C.-C-C)<sup>5'</sup>
- Templat 103: 3'r(G-C-G.-U-G-C.-U-U-C.-C-C.-C)<sup>5'</sup>
- Templat 104: 3'r(G-C-G.-U-G-C.-[D/C/G/T]-[D/C/G/T]-[D/C/G/T])<sup>5'</sup>

## 7.4 Oligomerisierungsexperimente

Die Lösungen für die Oligomerisierungsexperimente wurden nach dem Pipettierschema aus Tabelle 5 erstellt. Man mischte in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß Puffer, Wasser, Primer und Template, vortexte gründlich und zentrifugiert die Gefäße. Man erhitzte im Wasserbad 1 min. auf 90°C und stellte die Reaktionsgefäße anschließend in ein 10°C kaltes Kältebad. Nach 15 min. wurde die jeweilige Menge der frisch angesetzten Phosphorimidazolid-Lösungen zugesetzt. Man vortexte und zentrifugierte erneut und stellte die Lösungen wieder in das Kältebad.

Tabelle 5: Pipettierschema für Oligomerisierungsexperimente

	Konzentration	Menge	Endkonzentration
Puffer:			
TRIS·HCl, pH 7.7	0.5 M	15.0 µl	0.25 M
MgCl <sub>2</sub>	0.4 M		0.20 M
Wasser		9.0 µl	
Primer	1.0 mM	0.9 µl	30 µM
Templat	1.0 mM	1.8 µl	60 µM
2-MeImp	0.45 M	3.3 µl	50 mM
Gesamtvolumen		30 µl	

Zur Entnahme einer analytischen Probe wurde das Reaktionsgefäß aus dem Kältebad entnommen, gevortext und zentrifugiert. Man entnahm 1.0 µl der Reaktionslösung und versetzte es mit 99.0 µl Formamid. Das Reaktionsgefäß stellte man dann in das Kältebad zurück. Die so gewonnenen Proben lagerte man bis zur weiteren Verwendung bei -18°C.

Die Proben wurden mit einer 16%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Dazu verwendete man ein 0.5 mm Gel und den DNA-Sequencer *ALFExpress*. Für die Gelpräparation versetzte man 60 ml einer 16%ige Polyacrylamid-Stammlösung (Tabelle 6), die durch eine 0.45 µm Nylonmembran filtriert wurde, mit 450 µl APS (Tabelle 6) und 45 µl TEMED. Diese Lösung wurde in die Gelkassette gefüllt und darin ein Kamm mit 40

Taschen mit einem Volumen von je 10  $\mu\text{l}$  befestigt. Man ließ das Gel 2 h polymerisieren.

Für die Analyse verdünnte man 1  $\mu\text{l}$  der wie oben beschrieben gewonnenen Probe mit 10  $\mu\text{l}$  Ladepuffer (Tabelle 6). Davon pipettierte man 8  $\mu\text{l}$  in je eine Tasche des Gels. Der Gelträger wurde mit insgesamt 2 l Laufpuffer (Tabelle 6) befüllt. Als Laufbedingungen stellte man folgende Werte ein: 1500 V, 60 mA, 25 W, 55°C, 2 sec Aufnahmeintervall. Die Steuerung und Aufzeichnung erfolgte mit der Software *ALFWin Instrument Control* Version 2.00.15a von *AP Biotech* unter *Microsoft Windows95*. Die Daten wurde mit dem Programm *AlleleLinks* Version 1.0 von *AP Biotech* unter *Microsoft Windows95* ausgewertet.

Tabelle 6: Lösungen für die Gelelektrophorese

Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung	40% Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (19:1) von <i>Pharmacia</i> oder <i>Roth</i>
16%ige Polyacrylamid-Stammlösung	7.0 M Harnstoff, 1 x TBE, 16% Acrylamid/Bisacrylamid
APS	10% Ammoniumpersulfat in Wasser (m/v)
Stammlösung 10 x TBE	1.0 M TRIS, 0.8 M Borsäure, 10 mM EDTA
Laufpuffer	0.5 x TBE: 10 x TBE 1:10 mit Millipore Wasser verdünnt.
<i>ALFExpress</i> -Ladepuffer	5.0 mg/ml Dextran Blau in Formamid.

Die Werte in den folgenden Tabellen stellen die Mittelwerte aus mind. zwei Experimenten dar. In den meisten Fällen liegen ihnen drei Ergebnisse zugrunde. Anschließend wurde auf halbzahlige Werte gerundet. Ist die Summe der Produktanteile größer als 100%, ist das auf das Runden zurück zu führen.

## 7.4.1 Standard „GCACG“ Primer

### 7.4.1.1 Einbau von G

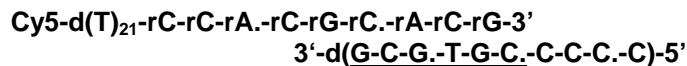


Tabelle 7: Primer 14, Templat 8, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	2.0	1.0	2.0	14.0	80.5
G	2	1.5	1.0	1.5	9.5	86.5
G	3	2.0	1.5	1.5	7.5	87.0
G	7	2.0	1.5	1.5	5.0	89.0
G	14	1.5	1.0	1.0	3.5	92.0

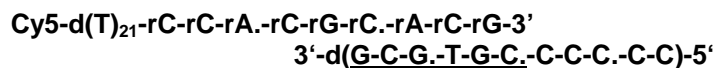


Tabelle 8: Primer 14, Templat 7, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	1.5	1.0	1.0	3.5	28.5	64.0
G	2	1.5	1.0	0.5	2.5	17.0	78.0
G	3	1.5	1.0	1.0	2.0	12.0	84.5
G	7	2.0	1.5	1.0	2.5	8.5	85.0
G	14	1.5	1.5	1.0	2.0	7.0	85.0
G	28	1.5	1.5	1.0	2.0	7.0	87.0

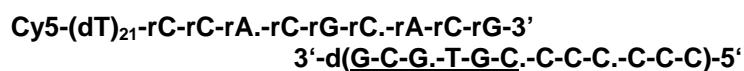


Tabelle 9: Primer 14, Templat 28, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G Li	1	5.0	2.5	2.5	3.5	8.0	41.0	37.5
G Na		3.0	2.0	2.5	4.0	8.0	39.0	41.5
G Li	2	2.5	1.5	1.0	3.0	6.5	28.0	57.5
G Na		2.0	1.5	1.0	2.5	5.5	24.0	63.0
G Li	3	2.0	1.5	1.0	3.0	5.5	22.0	65.0
G Na		2.0	1.5	1.0	2.5	4.5	17.0	72.0
G Li	7	2.0	1.5	1.0	2.5	4.5	13.5	75.0
G Na		1.5	1.0	1.0	2.0	3.0	9.5	79.0
G Li	14	2.0	1.5	1.0	2.0	4.5	11.5	77.5
G Na		1.5	1.5	1.0	1.5	4.0	10.5	80.0

Tabelle 10: Primer 14, Templat 28, Konz. Imidazolid: 100 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G Li	1	2.5	2.0	2.0	4.0	8.0	39.0	43.0
G Na		1.5	1.0	1.0	3.5	7.5	38.0	47.5
G Li	2	1.5	2.0	1.5	3.5	6.0	24.5	61.0
G Na		1.5	1.0	1.0	3.0	5.5	22.5	65.5
G Li	3	2.0	2.0	1.5	3.0	5.0	19.0	68.0
G Na		1.5	1.5	1.0	3.0	5.0	17.5	71.0
G Li	7	1.5	1.5	1.0	2.0	4.0	13.0	77.5
G Na		1.0	1.0	1.0	2.5	4.0	12.0	79.0
G Li	14	1.5	1.0	1.0	2.0	3.5	10.5	81.0
G Na		1.0	0.5	0.5	2.0	3.5	9.5	83.0

Tabelle 11: Primer 14, Templat 28, Konz. Imidazolid: 100 mM + 200 mM NaCl oder LiCl

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G Li	1	2.0	1.5	1.5	4.0	8.0	40.0	44.0
G Na		1.5	1.0	1.0	3.5	7.0	36.5	49.0
G Li	2	2.0	1.5	1.0	2.5	5.5	24.5	63.0
G Na		1.5	1.5	1.0	3.0	5.5	22.5	66.0
G Li	3	2.0	1.5	1.0	2.5	5.0	19.5	68.5
G Na		1.5	1.0	1.0	2.5	4.5	17.0	73.5
G Li	7	1.5	1.0	1.0	1.5	4.0	13.0	77.5
G Na		1.0	1.0	0.5	2.5	4.0	12.0	79.5
G Li	14	1.0	1.0	1.0	2.0	3.5	10.5	81.0
G Na		1.0	1.0	0.5	2.0	3.5	10.0	82.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C-C-C-C-C-C-C-C)-5'**

Tabelle 12: Primer 14, Templat 29, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G Li	1	2.0	2.5	1.5	2.5	4.5	6.0	10.0	39.0	32.5
G Na		6.0	4.5	3.5	3.0	4.5	5.5	8.5	32.5	32.5
G Li	2	2.0	1.5	1.5	2.0	3.0	4.5	7.0	27.5	51.0
G Na		3.0	2.0	1.5	2.0	3.5	5.0	8.0	25.0	50.1
G Li	3	2.0	1.5	1.0	1.5	2.5	5.0	7.5	20.5	58.5
G Na		2.5	2.0	1.5	2.0	3.0	5.0	7.0	18.5	58.0
G Li	7	1.5	1.0	1.0	1.5	2.0	4.5	6.0	16.0	67.5
G Na		3.0	2.5	2.0	2.0	3.0	4.5	6.0	12.5	64.0
G Li	14	2.0	1.5	1.5	2.0	2.0	4.5	6.0	12.0	69.0
G Na		3.0	3.0	2.0	2.0	3.0	4.5	6.5	11.0	65.0

Tabelle 13: Primer 14, Templat 29, Konz. Imidazolid: 100 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G Li	1	2.5	2.0	2.0	2.5	5.0	6.0	9.5	35.5	35.5
G Na		2.0	1.0	1.5	2.5	3.5	6.0	9.0	36.5	38.0
G Li	2	1.5	1.5	1.5	2.0	3.0	4.0	6.5	27.0	53.5
G Na		2.0	1.5	1.5	2.0	3.0	5.5	7.5	22.5	55.0
G Li	3	1.5	1.5	1.0	1.5	2.0	4.5	6.5	19.5	61.0
G Na		2.0	1.5	1.5	2.0	2.5	5.0	7.0	18.0	60.0
G Li	7	1.5	1.5	1.0	1.5	2.5	4.0	5.5	13.5	69.5
G Na		1.5	1.0	1.0	1.5	2.5	4.5	6.5	13.0	69.0
G Li	14	1.5	1.0	1.0	1.5	2.0	4.0	5.5	11.0	73.0
G Na		1.5	1.0	0.5	1.0	2.5	4.5	6.0	11.5	72.0

Tabelle 14: Primer 14, Templat 29, Konz. Imidazolid: 100 mM + 200 mM NaCl

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G Li	1	6,8	2.5	1.5	2.0	3.5	5.5	9.0	36.5	33.0
G Na		2.0	1.0	1.0	2.0	3.5	6.0	9.0	36.5	40.0
G Li	2	2.0	1.5	1.0	1.5	2.5	4.5	7.0	26.0	54.0
G Na		1.5	1.0	1.0	1.5	2.5	5.0	7.5	22.5	57.0
G Li	3	2.5	1.5	1.5	2.0	2.5	4.5	6.5	20.0	60.0
G Na		1.5	1.0	1.0	1.5	2.5	5.0	7.0	18.0	62.5
G Li	7	1.5	1.5	1.0	1.5	2.0	4.0	6.0	14.0	68.5
G Na		1.5	1.0	0.5	1.0	2.5	4.5	6.0	13.0	70.5
G Li	14	1.5	1.0	1.0	1.5	2.0	4.0	5.5	11.5	72.0
G Na		1.5	1.0	0.5	1.0	2.5	5.0	6.0	11.5	73.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C-C-C-C-C-C-C-C-C-C)-5'**

Tabelle 15: Primer 14, Templat 30, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
G Li	1	2.0	2.0	1.5	2.0	3.5	5.0	6.0	7.0	10.5	37.5	24.0
G Na		2.0	2.0	1.5	2.0	3.5	5.0	6.5	7.0	9.5	34.5	27.0
G Li	2	1.5	1.5	1.0	1.5	2.5	3.5	4.5	6.5	8.5	27.5	42.0
G Na		2.0	2.0	1.0	1.5	2.0	3.5	4.5	6.5	8.0	24.0	46.0
G Li	3	2.0	2.0	1.0	1.5	2.5	3.5	5.0	5.5	7.5	21.0	49.0
G Na		2.0	2.0	1.0	1.5	2.0	3.5	5.0	5.5	7.0	18.0	52.5
G Li	7	2.0	1.5	1.5	1.5	2.0	3.0	4.5	5.0	6.5	14.5	59.0
G Na		2.0	2.0	1.5	1.5	2.0	3.0	4.0	4.5	7.0	13.5	59.5
G Li	14	2.0	2.5	2.0	2.0	2.5	3.5	4.0	5.0	5.5	11.0	60.0
G Na		2.5	2.0	2.0	2.0	3.5	3.5	4.0	5.0	6.0	10.5	59.5

Tabelle 16: Primer 14, Templat 30, Konz. Imidazolid: 100 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
G Li	1	2.5	2.0	2.0	3.0	4.0	5.5	6.5	6.5	8.5	30.0	29.5
G Na		1.5	0.5	1.0	2.0	3.0	5.0	6.0	7.5	9.5	32.5	31.5
G Li	2	2.0	1.5	1.5	2.0	3.0	4.0	4.5	5.5	7.0	22.5	46.5
G Na		2.0	1.0	1.0	1.5	3.0	4.0	4.5	5.0	7.0	22.5	48.5
G Li	3	2.0	1.5	1.5	2.0	3.0	4.0	4.5	4.5	6.5	18.0	53.0
G Na		2.5	2.0	1.5	2.0	2.5	3.5	3.5	4.0	6.5	18.0	55.0
G Li	7	1.5	1.5	1.5	2.0	2.5	3.5	4.0	4.5	6.0	12.0	62.0
G Na		1.5	1.5	1.0	1.5	2.5	3.0	3.5	5.5	7.0	13.0	61.0
G Li	14	1.5	1.5	1.0	1.5	2.5	3.5	3.5	4.5	5.5	10.5	65.0
G Na		1.0	1.5	0.5	1.5	2.5	3.0	3.5	4.5	6.0	11.0	66.0

Tabelle 17: Primer 14, Templat 30, Konz. Imidazolid: 100 mM + 200 mM NaCl

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
G Li	1	2.0	1.0	1.5	2.0	3.5	5.5	6.5	6.5	9.0	34.5	29.0
G Na		1.5	1.0	1.0	2.0	3.0	5.0	5.5	6.5	9.0	34.5	31.5
G Li	2	2.0	1.5	1.0	2.0	3.0	4.5	5.0	5.0	6.5	22.5	47.0
G Na		2.0	1.5	1.5	2.0	2.5	3.5	4.0	4.5	7.0	22.0	50.0
G Li	3	1.5	1.5	1.5	1.5	2.5	4.0	4.5	4.5	6.5	18.5	54.0
G Na		1.5	1.5	1.0	1.5	2.5	3.5	4.0	4.5	7.0	17.5	55.5
G Li	7	1.5	1.5	1.5	2.0	2.5	3.5	3.5	4.0	6.0	13.0	61.0
G Na		1.0	1.0	1.0	1.5	2.5	3.0	3.5	5.0	6.5	12.5	61.5
G Li	14	1.5	1.5	1.0	1.5	2.5	3.5	3.5	4.5	6.0	11.0	64.0
G Na		1.5	1.0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	6.0	11.0	66.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C-C-C-C-C-C-C-C-C-C-C-C)-5'**

Tabelle 18: Primer 14, Templat 31, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+ 13
G Li	1	2.5	1.5	2.5	4.5	6.0	7.5	8.5	9.5	9.0	8.5	9.5	19.0	11.0
G Na		3.5	2.5	3.0	4.5	6.0	7.5	8.5	9.5	9.0	8.5	9.0	17.0	13.0
G Li	2	2.0	1.5	2.0	4.0	5.0	6.5	7.5	9.5	9.0	9.0	9.5	16.5	18.5
G Na		2.5	1.5	2.0	3.5	4.5	6.0	7.0	9.0	9.0	9.0	9.5	15.5	21.5
G Li	3	1.5	1.5	2.5	4.0	5.5	7.0	8.0	8.5	8.5	9.0	12.0	11.5	24.0
G Na		2.5	1.5	2.0	3.0	4.5	6.0	7.5	8.0	8.0	8.5	10.0	13.5	24.0
G Li	7	2.0	1.5	1.5	3.0	4.0	5.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	12.0	30.5
G Na		2.0	1.5	2.0	3.5	4.0	6.0	7.0	7.5	7.5	8.5	9.5	12.0	29.5
G Li	14	2.0	1.5	2.0	3.0	4.5	6.0	7.0	8.0	7.5	7.5	8.0	11.0	32.0
G Na		2.0	1.5	2.0	3.5	4.5	6.0	7.0	7.5	7.5	7.5	8.0	11.0	32.5

Tabelle 19: Primer 14, Templat 31, Konz. Imidazolid: 100 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+ 13
G Li	1	2.0	1.5	2.0	4.0	6.0	7.5	9.0	10.0	9.5	8.5	9.5	17.5	12.5
G Na		2.0	1.0	1.5	4.0	6.0	8.0	9.5	10.5	10.0	8.5	9.0	18.0	11.5
G Li	2	2.5	2.0	2.5	4.0	5.0	6.5	7.5	10.0	9.0	8.5	9.0	14.5	20.0
G Na		2.0	1.5	2.0	3.5	5.0	6.5	8.0	8.5	8.5	9.0	9.5	15.5	22.0
G Li	3	2.0	1.5	2.0	3.5	5.0	6.5	8.0	9.0	9.0	8.5	9.0	15.0	21.0
G Na		2.0	1.5	2.0	3.0	4.5	6.5	7.5	8.5	8.0	8.5	9.5	14.0	25.0
G Li	7	1.5	1.0	1.5	2.5	4.0	5.5	7.0	8.0	8.0	8.0	9.0	12.0	31.5
G Na		1.5	1.0	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	8.0	8.0	8.0	8.5	12.0	30.5
G Li	14	2.0	2.0	2.0	3.0	4.5	6.0	7.0	7.5	7.5	7.5	8.0	10.5	32.0
G Na		1.5	1.0	1.0	3.0	4.5	6.0	7.0	7.0	7.5	8.0	8.5	11.0	35.0

Tabelle 20: Primer 14, Templat 31, Konz. Imidazolid: 100 mM + 200 mM NaCl

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+ 13
G Li	1	2.5	1.0	2.0	4.5	6.5	8.5	10.0	10.5	9.5	8.5	8.5	17.5	10.5
G Na		2.0	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	9.5	10.0	9.5	9.0	9.0	18.0	13.0
G Li	2	2.0	1.0	2.0	3.5	5.0	6.5	8.5	9.0	8.5	8.0	8.5	15.0	22.0
G Na		2.0	1.0	1.5	3.0	5.0	6.5	8.0	8.5	8.5	8.5	9.0	15.0	24.0
G Li	3	2.0	1.0	1.5	3.0	4.5	6.5	8.0	8.5	8.5	8.5	9.0	14.0	26.0
G Na		1.5	1.0	1.5	3.0	4.5	6.0	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	14.5	28.0
G Li	7	2.0	1.0	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	8.5	8.0	8.0	8.0	12.0	31.0
G Na		1.5	1.0	1.0	3.0	4.5	6.0	7.5	7.5	8.0	8.0	8.5	12.0	32.0
G Li	14	2.0	1.5	2.0	3.0	4.5	6.0	7.0	8.0	7.5	8.0	8.0	10.5	32.5
G Na		1.5	1.0	1.0	2.5	4.5	6.0	7.0	7.0	7.5	8.0	8.5	11.0	35.5

### 7.4.1.2 Einbau von C

Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'  
 3'-d(G-C-G.-T-G-C.-G-G-G.-G)-5'

Tabelle 21: Primer 14, Templat 48, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
C Li	1	9.5	8.0	52.0	29.0	1.5
C Na		11.0	8.5	43.0	35.0	2.5
C Li	2	9.0	7.0	38.4	41.5	4.0
C Na		8.5	6.0	37.0	44.0	5.0
C Li	3	8.0	5.5	32.5	47.0	7.0
C Na		7.5	5.5	31.0	48.5	8.0
C Li	7	6.0	4.0	20.5	53.0	15.0
C Na		7.0	5.0	18.5	52.0	18.0
C Li	14	5.0	4.0	15.0	52.0	24.0
C Na		6.5	5.0	13.5	45.5	29.5



Tabelle 22: Primer 14, Templat 48, Konz. Imidazolid: 100 mM

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
C Li	1	7.5	4.5	29.5	51.5	6.5
C Na		8.0	5.5	35.0	47.0	4.5
C Li	2	5.5	3.5	18.0	60.0	12.5
C Na		7.0	5.0	22.0	55.0	11.0
C Li	3	6.5	4.0	15.0	56.0	19.0
C Na		6.0	4.0	16.5	57.5	16.5
C Li	7	5.0	3.5	8.5	50.0	33.0
C Na		5.5	3.5	10.0	51.0	32.0
C Li	14	4.5	3.0	6.5	40.0	45.0
C Na		6.0	4.5	8.0	39.5	42.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C-G-G-G-G-G-G)-5'**

Tabelle 23: Primer 14, Templat 61, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
C Li	1	33.5	17.0	16.5	16.0	13.5	3.5	
C Na		35.0	18.0	17.5	15.5	11.0	2.5	
C Li	2	20.0	11.0	13.0	18.5	25.5	10.5	1.0
C Na		28.5	15.5	15.5	16.5	16.5	7.0	0.5
C Li	3	17.5	10.5	11.0	16.0	27.0	15.5	2.5
C Na		23.0	14.0	14.5	15.5	20.5	11.5	1.5
C Li	7	9.5	7.0	7.5	10.0	23.5	29.5	13.5
C Na		17.0	13.5	12.6	13.0	18.5	17.5	8.0
C Li	14	9.5	7.5	7.5	9.5	21.5	27.5	17.0
C Na		14.5	11.5	11.5	13.5	19.1	19.5	11.0
C Li	28	8.5	7.0	7.0	8.5	19.5	26.5	24.0
C Na		13.5	12.0	11.5	11.0	17.0	19.5	16.0

Tabelle 24: Primer 14, Templat 61, Konz. Imidazolid: 100 mM

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
C Li	1	19.5	11.5	14.0	18.0	24.0	11.5	1.0
C Na		20.0	14.0	14.5	16.0	20.5	13.0	2.0
C Li	2	13.5	8.0	9.5	13.0	26.0	25.0	5.0
C Na		16.5	10.0	11.5	14.0	22.5	21.5	3.5
C Li	3	11.5	8.0	8.5	11.0	23.0	29.5	8.5
C Na		13.5	9.0	10.0	12.0	21.0	27.5	7.0
C Li	7	9.0	8.0	7.0	8.0	17.5	32.0	19.5
C Na		10.5	7.5	8.5	9.5	17.0	29.0	18.0
C Li	14	7.5	6.0	6.5	8.5	14.5	28.5	25.5
C Na		9.5	8.5	7.5	9.0	14.5	25.5	24.0
C Li	28	6.5	5.5	5.5	7.0	13.0	24.5	38.5
C Na		8.0	7.5	7.5	8.5	13.0	21.5	34.5

Tabelle 25: Primer 14, Templat 61, Konz. Imidazolid: 100 mM + 200 mM NaCl

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
C Li	1	18.0	11.0	13.5	17.5	25.5	13.5	1.5
C Na		35.5	18.0	15.5	11.0	12.0	7.0	1.0
C Li	2	14.0	8.5	10.0	13.0	25.0	24.5	5.0
C Na		30.5	15.5	15.5	11.0	13.0	12.5	2.5
C Li	3	11.5	8.0	8.5	11.0	22.5	29.5	9.0
C Na		25.5	15.0	13.0	11.0	14.0	17.0	5.0
C Li	7	9.0	6.5	6.5	8.5	17.5	32.0	20.0
C Na		18.5	14.0	12.0	11.0	15.5	18.6	10.5
C Li	14	6.5	4.5	4.0	5.5	13.0	28.5	38.5
C Na		16.5	13.5	11.5	11.0	14.5	18.0	15.5
C Li	28	6.5	6.0	6.0	7.0	12.5	23.5	39.5
C Na		14.5	14.0	11.5	10.5	12.0	15.0	22.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-G-G-G.-G-G-G-G)-5'**

Tabelle 26: Primer 14, Templat 62, Konz. Imidazolid 50 mM

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
C Li	1	49.0	23.0	14.5	7.0	3.0	2.0	1.0		
C Na		50.5	24.0	15.0	6.0	2.5	1.0	1.5		
C Li	2	40.5	20.0	15.5	9.5	4.5	4.0	4.0	1.5	
C Na		42.5	22.5	17.0	8.5	4.0	3.0	2.0	0.5	
C Li	3	35.0	19.0	15.5	10.0	5.5	5.0	6.5	3.5	
C Na		38.0	22.0	17.5	10.0	5.0	3.5	3.5	1.5	0.5
C Li	7	28.0	17.5	14.0	10.5	5.5	4.5	9.0	8.5	2.5
C Na		31.0	20.5	17.0	11.5	6.0	4.0	5.5	4.5	0.5
C Li	14	21.5	18.0	14.0	11.0	6.5	5.0	8.0	9.5	6.5
C Na		23.5	18.0	15.0	12.0	8.5	8.0	8.0	5.5	2.5
C Li	28	20.0	17.0	13.5	10.5	7.0	5.0	8.0	10.5	9.5
C Na		23.0	20.0	15.5	11.0	6.5	5.0	6.0	7.0	5.5

Tabelle 27: Primer 14, Templat 62, Konz. Imidazolid 100 mM

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
C Li	1	36.0	19.5	15.5	9.5	6.0	5.0	6.0	2.5	
C Na		38.5	21.5	17.5	9.5	5.0	3.5	3.5	1.5	
C Li	2	28.5	16.0	14.0	9.5	5.5	5.5	10.5	9.0	0.5
C Na		32.0	19.0	17.0	10.5	6.0	4.5	6.0	5.0	0.5
C Li	3	25.0	16.0	13.5	9.5	5.5	5.0	10.0	12.5	3.5
C Na		27.0	17.5	15.5	11.0	7.5	5.0	7.0	7.5	1.5
C Li	7	19.5	15.0	13.0	10.0	6.0	4.0	7.5	15.5	10.0
C Na		21.5	16.5	14.0	11.5	7.5	5.0	7.0	11.0	6.5
C Li	14	18.0	15.5	12.5	10.0	6.0	4.5	6.5	13.0	14.5
C Na		18.0	15.5	14.0	11.5	7.5	5.5	6.5	10.5	12.5
C Li	28	13.0	14.0	12.0	10.0	7.0	5.0	5.5	11.0	22.0
C Na		16.0	16.0	13.0	10.5	7.5	5.5	6.0	9.0	16.5

Tabelle 28: Primer 14, Templat 62, Konz. Imidazolid 100 mM + 200 mM NaCl

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
C Li	1	36.0	20.5	16.0	10.0	6.0	5.0	5.0	2.0	
C Na		47.0	24.5	15.0	7.0	3.0	1.5	1.5	0.5	
C Li	2	29.0	17.5	15.0	10.0	6.0	5.5	9.5	7.5	1.0
C Na		41.5	23.0	16.5	8.5	4.0	2.5	2.5	1.5	
C Li	3	24.0	16.0	14.0	10.5	6.0	5.0	10.0	11.5	3.0
C Na		36.5	23.0	17.0	9.5	4.5	3.0	3.0	3.0	0.5
C Li	7	20.0	15.0	13.0	10.5	6.5	4.5	8.0	14.5	3.5
C Na		29.0	22.0	16.5	10.5	5.5	3.5	4.5	6.0	3.0
C Li	14	14.5	14.0	13.0	10.5	7.5	5.5	7.0	13.0	13.5
C Na		24.0	21.0	16.0	11.0	6.5	4.0	5.0	6.5	6.0
C Li	28	14.0	14.5	13.0	10.5	7.5	5.5	6.0	10.5	18.5
C Na		18.5	20.0	16.0	11.5	7.0	5.0	5.0	6.5	10.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G)-5'**

Tabelle 29: Primer 14, Templat 63, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
C Li	1	48.5	27.5	15.5	6.0	1.5	1.0					
C Na		50.0	27.0	16.0	5.5	1.5	0.5					
C Li	2	43.5	24.5	18.5	8.0	3.0	1.5	0.5	0.5			
C Na		44.5	25.0	19.0	8.0	2.5	1.0	0.5				
C Li	3	38.5	24.0	19.5	9.5	4.0	2.0	1.0	1.0	1.0		
C Na		39.0	23.0	19.5	10.0	2.5	1.5	1.0	1.0	0.5		
C Li	7	32.5	21.5	19.0	11.5	5.0	2.5	2.0	2.0	3.0	1.5	
C Na		34.5	22.0	20.0	12.5	5.0	2.5	1.5	1.0	1.0	0.5	
C Li	14	23.5	21.0	18.5	13.0	7.0	3.5	2.5	2.5	4.0	3.5	1.5
C Na		25.0	20.5	18.5	13.0	7.0	3.0	3.5	4.5	2.5	2.0	0.5
C Li	28	21.5	20.5	18.0	13.0	7.0	3.5	2.5	2.5	4.0	5.0	3.0
C Na		24.5	20.0	20.0	13.5	7.0	3.5	2.5	2.5	3.0	2.0	1.5

Tabelle 30: Primer 14, Templat 63, Konz. Imidazolid: 100 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
C Li	1	38.0	26.0	19.5	9.0	4.0	2.0	1.0	1.0	0.5		
C Na		37.5	22.0	20.1	10.0	4.5	2.5	2.0	1.0			
C Li	2	33.0	22.0	20.0	10.5	4.5	2.5	2.0	2.0	2.5	1.0	
C Na		32.5	21.5	22.5	12.5	5.5	2.5	1.5	1.0	1.0	0.5	
C Li	3	28.0	20.5	19.0	11.5	5.5	3.0	2.5	2.6	4.5	3.0	2.5
C Na		28.5	19.5	21.0	14.0	6.5	3.5	2.5	2.5	2.0	1.0	0.5
C Li	7	22.0	18.0	17.0	12.5	6.5	3.5	2.5	2.5	5.5	7.0	3.5
C Na		23.5	18.5	19.0	15.5	8.0	4.0	2.5	2.0	3.0	3.0	
C Li	14	19.0	18.5	17.0	13.5	7.0	3.5	2.5	2.5	4.5	6.5	6.0
C Na		18.5	17.5	18.0	15.5	9.0	5.0	3.0	2.5	3.5	4.0	3.0
C Li	28	14.5	16.0	15.5	13.0	8.0	4.5	3.0	2.5	4.0	7.0	11.5
C Na		17.5	18.5	17.0	14.0	8.5	5.0	3.5	2.5	3.5	4.0	6.0

Tabelle 31: Primer 14, Templat 63, Konz. Imidazolid: 100 mM + 200 mM NaCl

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
C Li	1	38.0	25.5	20.0	9.5	3.5	2.0	1.0	0.5	0.5		
C Na		43.5	27.5	23.0	7.5	2.5	1.0	0.5				
C Li	2	32.5	22.5	20.5	11.0	4.5	2.5	2.0	2.0	2.0	1.0	
C Na		40.5	24.5	20.0	9.0	3.5	1.5	0.5	0.5	0.5		
C Li	3	26.5	21.0	19.5	12.5	5.5	3.0	2.5	2.5	4.0	3.0	0.5
C Na		36.0	23.5	20.0	11.0	4.0	2.0	1.0	1.0	0.5	0.5	
C Li	7	22.0	18.5	17.5	12.5	6.5	3.5	2.5	2.5	5.0	6.5	3.0
C Na		30.0	23.0	20.0	13.0	6.0	2.5	1.5	1.0	1.5	1.5	0.5
C Li	14	18.0	17.5	17.0	13.0	7.0	4.0	2.5	2.5	4.5	7.0	6.5
C Na		24.0	22.0	19.0	14.0	7.5	3.5	2.0	2.0	2.5	2.0	1.5
C Li	28	15.0	16.5	16.5	13.5	8.5	4.5	3.0	2.5	4.0	6.5	9.5
C Na		20.5	21.5	19.0	14.5	8.0	4.0	2.5	2.0	2.5	2.5	3.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G)-5'**

Tabelle 32: Primer 14, Templat 64, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+13
C Li	1	37.5	43.0	9.0	4.0	3.5	1.5	1.0	0.5					
C Na		38.0	42.5	15.5	7.5	3.0	1.0	0.5						
C Li	2	39.5	32.0	10.0	10.0	5.0	2.5	1.5						
C Na		35.5	38.5	17.0	9.5	4.5	2.0	0.5						
C Li	3	27.0	34.5	12.5	10.0	5.5	6.5	2.5	1.5	1.0	0.5			
C Na		29.5	37.5	18.0	10.5	5.5	4.0	1.5	0.5	0.5				
C Li	7	21.5	30.0	16.5	12.0	7.0	4.0	3.0	3.0	1.5	1.0	0.5		
C Na		26.5	33.0	18.5	11.5	6.5	3.5	2.0	1.5	0.5	0.5			
C Li	14	18.0	26.5	15.5	12.0	7.5	4.5	2.5	2.0	3.5	2.5	1.5	0.5	
C Na		20.0	31.0	19.5	13.5	8.0	4.5	2.5	1.5	1.5	1.5	1.0		
C Li	28	17.5	25.5	16.5	11.0	6.0	5.0	3.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5
C Na		19.5	27.0	17.0	12.5	8.0	4.0	2.5	2.5	2.5	2.0	2.0	0.5	

Tabelle 33: Primer 14, Templat 64, Konz. Imidazolid: 100 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+13
C Li	1	50.0	23.0	13.0	7.0	3.5	1.5	1.5	0.5					
C Na		53.0	22.5	13.0	6.5	3.5	2.0							
C Li	2	45.0	23.0	13.0	6.0	4.0	3.5	2.0	1.5	1.5	0.5			
C Na		47.0	22.0	14.5	7.5	4.0	2.5	1.5	1.0	0.5				
C Li	3	39.0	23.5	14.5	7.5	4.0	3.0	1.5	2.0	1.5	1.5	1.0	1.0	
C Na		41.0	22.0	15.5	8.5	5.0	3.0	2.0	1.5	1.0	0.5	0.5		
C Li	7	31.0	24.0	15.5	8.0	5.5	3.5	2.5	2.5	2.5	2.0	2.0	1.5	1.0
C Na		35.0	22.5	15.5	9.0	5.5	3.5	3.0	1.5	1.5	1.0	1.0	1.0	0.5
C Li	14	30.0	23.0	15.0	9.5	5.0	3.0	3.0	1.5	1.5	1.5	2.0	1.5	2.0
C Na		31.5	23.5	15.5	9.5	5.5	3.5	2.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.0
C Li	28	25.5	23.5	17.5	10.0	6.0	3.5	2.0	1.5	1.0	1.0	2.0	2.5	3.0
C Na		27.0	24.0	16.5	10.0	6.0	4.0	2.5	2.0	1.5	1.5	1.5	1.5	2.0

Tabelle 34: Primer 14, Templat 64, Konz. Imidazolid: 100 mM + 200 mM NaCl

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+ 13
C Li	1	53.0	24.5	10.0	5.5	2.5	1.5	0.5	0.5					
C Na		57.0	24.5	11.0	4.5	2.0	1.0	0.5						
C Li	2	48.0	24.0	14.0	7.0	3.5	2.0	1.0	0.5	0.5				
C Na		52.5	24.0	13.0	6.0	2.5	1.5	0.5	0.5					
C Li	3	41.5	24.5	15.0	7.5	4.0	2.5	1.5	1.0	1.0	0.5	0.5		
C Na		46.5	25.0	14.0	6.5	3.0	2.0	1.0	0.5					
C Li	7	37.0	25.5	16.5	8.5	4.5	2.5	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	
C Na		41.0	25.5	15.0	8.0	4.0	2.5	1.5	1.0	0.5	0.5	0.5		
C Li	14	29.0	24.0	16.0	9.5	5.5	3.5	2.5	2.0	1.5	1.5	2.5	2.0	1.5
C Na		34.0	26.0	16.0	9.5	5.5	3.0	2.0	1.5	1.0	0.5	0.5	0.5	
C Li	28	25.0	23.5	17.0	10.5	6.0	3.5	2.5	2.0	1.5	1.5	2.0	2.0	3.0
C Na		29.5	26.0	17.0	10.5	6.0	3.5	2.0	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5

### 7.4.1.3 Einbau von G und C

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-G-C-C.-C-C)-5'**

Tabelle 35: Primer 14, Templat 46, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	83.0	9.5	3.0	3.0	1.0	
G,C		22.5	26.5	9.0	11.0	22.5	9.0
G	2	76.0	11.5	4.0	5.0	3.5	0.5
G,C		12.0	16.0	7.0	10.0	28.0	27.0
G	3	68.5	14.5	5.0	6.0	5.0	1.0
G,C		10.0	13.5	5.0	8.0	28.5	35.0
G	7	59.0	15.0	5.5	7.5	10.0	3.5
G,C		5.0	7.0	3.5	4.0	17.0	63.5
G	14	55.5	15.5	5.5	6.5	11.0	6.0
G,C		5.0	7.0	2.5	3.0	11.0	70.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-G-C.-C-C)-5'**

Tabelle 36: Primer 14, Templat 47, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	66.0	30.0	3.0	0.5	0.5	
G,C		21.5	12.5	33.0	13.5	15.0	6.0
G	2	52.5	39.5	6.0	1.5	1.0	
G,C Na		14.5	10.5	23.5	12.0	21.0	19.0
G	3	46.0	45.0	7.5	1.5	1.0	
G,C		12.0	9.5	19.5	11.5	21.5	26.5
G	7	32.5	50.0	12.0	3.0	2.0	0.5
G,C		8.0	8.0	11.5	8.5	15.5	48.0
G	14	26.0	51.0	15.0	3.5	3.0	
G,C		6.0	7.5	8.5	6.5	11.5	60.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G.-C)-5'**

Tabelle 37: Primer 14, Templat 75, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
G	1	11.5	67.0	20.5	1.0							
G,C		17.0	37.5	24.0	15.5	4.5	1.5	0.5				
G	2	10.0	54.5	33.5	2.0	0.5						
G,C		12.5	27.5	23.0	22.5	8.5	2.5	2.5	1.0	0.5		
G	3	8.5	47.0	39.5	4.0	1.0						
G,C		9.0	21.5	20.5	25.5	11.5	4.0	5.0	2.0	1.0	0.5	
G	7	7.5	32.5	53.5	5.5	1.0	0.5					
G,C		7.0	12.5	15.0	23.0	14.5	6.0	9.5	5.5	3.0	1.5	
G	14	6.5	20.5	50.0	11.0	5.0	2.0	2.5	1.5	0.5	1.0	0.5
G,C		6.0	9.0	12.0	19.5	15.0	6.5	11.5	8.0	4.0	6.5	1.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G)-5'**

Tabelle 38: Primer 14, Templat 76, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+13
G	1	24.0	66.0	9.5	1.0									
G,C		24.0	32.5	18.5	22.0	3.0	0.5							
G	2	13.0	66.5	18.5	2.0									
G,C		15.5	24.5	17.0	35.5	7.0	1.0	0.5						
G	3	11.0	64.0	21.5	3.0	0.5								
G,C		11.0	19.5	14.5	41.0	11.0	1.5	1.0	0.5					
G	7	9.0	54.0	32.0	4.5	1.0								
G,C		7.0	12.5	11.5	42.5	19.5	3.0	2.0	1.0	0.5	0.5			
G	14	8.0	44.5	39.0	7.0	1.5	0.5							
G,C		6.0	9.5	10.0	36.5	24.5	5.5	3.5	2.5	1.0	1.0	0.5		

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G.-C-C-G.-C-C)-5'**

Tabelle 39: Primer 14, Templat 77, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13+14
G	1	11.0	66.0	21.5	1.5										
G,C		18.0	35.5	35.5	16.5	3.5	0.5								
G	2	8.5	48.5	38.5	3.5	1.0									
G,C		13.0	35.5	26.5	42.0	7.5	2.0	1.0	0.5						
G	3	7.5	46.0	43.0	3.0	0.5									
G,C		9.5	19.0	24.0	28.5	12.0	3.0	2.0	1.0						
G	7	5.0	30.5	59.5	4.5	0.5									
G,C		7.5	11.5	17.5	28.0	18.5	6.0	6.0	5.5	3.5	1.0	0.5			
G	14	6.5	22.5	61.5	8.0	1.5	0.5								
G,C		6.5	8.5	13.5	23.5	20.0	7.5	7.5	5.5	2.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5

## 7.4.1.4 Einbau von G und D/A

Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'  
 3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-C-T.-C-C-T.-C-C-T.-C)-5'

Tabelle 40: Primer 14, Templat 19, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
G	1	10.0	11.5	53.5	10.0	7.5	7.0	1.0				
G,A		6.0	9.5	11.5	21.5	23.0	12.0	10.0	5.0	1.5	0.5	
G,D		5.0	3.5	3.5	9.0	7.5	6.5	14.0	17.0	11.5	15.0	7.5
G,D,C,U		15.5	21.0	11.0	23.0	14.0	5.5	6.0	2.5	0.5	0.5	
G	2	4.5	6.0	45.5	12.0	10.0	16.0	3.5	2.	0.5		
G,A		3.5	4.0	6.0	12.5	16.5	15.0	18.0	14.0	6.5	3.0	0.5
G,D		4.0	2.0	2.5	6.0	4.0	4.5	9.0	10.5	11.5	22.5	23.0
G,D,C,U		8.5	11.0	8.5	20.0	15.5	9.0	13.5	8.0	3.5	2.0	1.0
G	3	3.5	5.0	37.0	12.0	10.5	20.5	5.5	4.0	2.0	0.5	
G,A		3.0	3.5	5.0	9.0	11.0	13.5	18.0	16.5	11.0	6.0	2.5
G,D		3.5	2.0	2.0	5.0	3.0	4.0	7.0	7.0	9.0	19.0	37.5
G,D,C,U		7.5	9.0	7.5	16.0	13.5	9.5	15.0	10.5	6.0	4.0	2.5
G	7	3.0	4.5	24.0	10.5	8.5	24.5	9.0	8.0	6.5	1.5	0.5
G,A		3.0	2.5	4.0	5.0	6.0	11.5	13.0	15.0	17.5	12.5	9.0
G,D		3.5	2.0	2.0	5.0	3.0	3.5	6.0	5.5	7.5	14.0	48.5
G,D,C,U		3.5	5.5	5.0	10.5	9.5	9.5	14.5	13.5	11.5	8.5	8.0
G	14	3.0	4.0	17.5	9.0	8.0	23.0	10.5	9.5	11.0	3.0	1.5
G,A		3.5	3.0	3.5	5.0	5.0	10.0	10.5	11.5	18.5	13.5	16.0
G,D		3.5	2.0	2.5	5.0	3.0	3.5	5.5	5.0	6.5	10.0	50.5
G,D,C,U		4.0	5.5	5.0	8.5	8.0	9.0	12.0	12.0	12.5	9.0	15.5

Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'  
 d(G-C-G.-T-G-C.-C-C-T.-C-C-T.-C-C-T.-C-C-T)-5'

Tabelle 41: Primer 14, Templat 20, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+13
G	1	8.0	9.5	57.0	9.5	7.5	6.0	1.5	0.5					
G,A		7.0	12.0	11.5	24.0	19.5	9.0	9.0	5.0	2.0	1.0			
G,D		5.0	3.0	3.0	13.0	6.5	5.5	13.0	10.0	6.0	11.0	14.0	8.0	2.0
G,D,C,U		15.5	20.0	12.0	23.0	13.5	5.5	7.5	3.0	1.0	0.5			
G	2	5.0	6.0	46.0	11.5	9.5	14.5	3.5	2.5	1.5				
G,A		4.5	5.0	7.0	15.0	15.0	12.0	16.0	11.5	6.5	4.5	2.0	0.5	
G,D		4.5	2.5	3.0	9.0	4.0	4.0	9.0	8.0	5.5	10.0	18.0	18.0	6.0
G,D,C,U		6.0	8.0	7.0	19.0	17.5	8.5	14.5	9.5	5.0	4.0	2.5	1.0	
G	3	4.5	5.5	37.0	11.5	9.5	18.5	5.5	4.5	3.5	1.0			
G,A		5.5	4.5	6.0	11.0	10.5	11.0	16.0	12.5	9.0	8.0	4.5	1.5	0.5
G,D		3.5	1.5	1.5	8.5	3.0	3.5	8.5	6.0	5.0	8.0	16.5	35.5	11.5
G,D,C,U		5.5	6.5	6.0	16.0	12.0	9.0	14.5	11.0	7.0	6.0	4.5	2.0	1.0
G	7	4.0	4.0	23.5	9.5	7.5	21.5	8.0	7.5	10.5	3.0	1.5	0.5	
G,A		3.5	2.5	3.5	6.0	5.5	9.0	12.0	11.0	13.5	13.5	11.0	7.0	2.5
G,D		3.5	2.0	2.0	7.5	3.0	3.5	7.0	5.0	4.0	6.0	11.5	24.0	22.0
G,D,C,U		3.0	3.0	3.0	9.0	7.5	8.0	12.5	12.0	11.5	11.0	11.5	6.5	2.5
G	14	3.5	4.0	17.0	8.0	7.0	20.0	8.5	8.5	14.0	5.0	3.0	1.5	0.5
G,A		3.5	3.0	3.5	5.0	4.5	8.0	9.5	8.5	13.0	12.0	12.0	11.5	5.5
G,D		3.0	2.0	2.0	6.5	3.0	3.5	7.0	5.0	4.5	5.0	9.5	21.0	28.5
G,D,C,U		3.0	3.5	3.5	7.0	6.0	7.5	10.0	10.0	11.0	11.5	11.0	7.0	3.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-C-T.-C-C-T.-C-C-T.-C-C)-5'**

Tabelle 42: Primer 14, Templat 55, Konz. Imidazolide 50 mM

2Melmp N	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14+ 15
G	1	4.5	3.5	9.0	6.5	34.0	39.0	3.5	0.5							
G,D		4.0	3.0	3.5	10.5	37.0	23.5	6.0	2.0	1.5	3.0	1.5	1.0	1.5	1.5	0.5
G,D,C,U		17.0	16.0	17.5	22.0	17.5	5.5	2.5	1.0	0.5						
G	2	4.5	5.0	6.5	6.0	21.0	48.0	6.5	1.5	1.0	0.5					
G,D		3.5	2.5	3.0	7.0	28.5	34.0	7.5	1.5	1.0	2.5	1.5	1.0	1.5	2.0	1.5
G,D,C,U		8.5	9.5	12.0	20.5	25.0	9.0	3.5	1.5	1.5	1.0	0.5				
G	3	4.0	3.0	5.0	4.0	16.0	54.5	9.0	2.0	1.5	0.5					
G,D		3.0	2.5	2.0	6.0	22.0	41.0	10.0	1.5	1.0	2.0	1.0	1.0	1.5	2.5	3.5
G,D,C,U		6.5	7.0	9.5	17.5	25.5	19.0	7.0	2.5	1.5	2.0	1.0	0.5	0.5		
G	7	3.0	2.5	3.5	3.0	9.0	53.5	16.0	3.5	3.5	1.0	1.0	1.0			
G,D		2.5	2.0	1.5	4.5	12.0	43.0	16.5	3.0	1.5	2.0	1.5	2.0	2.0	2.5	4.5
G,D,C,U		5.0	5.0	6.0	11.5	20.5	27.5	11.0	3.5	2.0	3.0	1.5	1.5	1.0	1.0	0.5
G	14	3.0	2.5	3.0	3.5	7.5	45.0	21.	4.5	4.0	1.5	1.0	1.5	0.5		
G,D		2.5	2.0	1.5	4.0	9.0	40.5	23.0	4.0	1.5	1.5	0.5	0.5	1.0	2.5	7.0
G,D,C,U		4.0	4.5	5.5	9.0	16.0	28.5	14.0	4.5	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	1.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-C-T.-T-C-C)-5'**

Tabelle 43: Primer 14, Templat 32, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	6.5	36.0	54.0	3.0	0.5		
G,D		6.5	10.0	16.5	10.0	14.5	31.0	11.5
G	2	5.0	22.0	67.0	6.0	0.5		
G,D		4.5	4.5	13.0	6.5	11.5	33.0	27.0
G	3	6.0	15.5	67.5	9.5	1.0	0.5	
G,D		4.0	4.5	12.5	5.5	7.5	29.0	37.5
G	7	4.0	9.5	69.5	14.5	2.0	0.5	
G,D		4.0	3.0	5.0	4.0	6.0	23.5	59.5
G	14	3.5	6.5	64.0	21.0	3.5	1.5	0.5
G,D		2.5	2.0	4.5	2.5	4.0	16.0	68.5



**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C-T-C-C-C-C)-5'**

Tabelle 44: Primer 14, Templat 91, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	44.5	6.5	3.5	7.0	28.5	10.0
A,G		5.5	7.0	5.0	11.0	43.5	30.0
D,G		5.0	4.5	4.0	10.0	51.0	26.0
G	2	24.5	5.0	2.5	6.0	35.5	27.0
A,G		3.5	3.5	3.5	6.5	35.5	48.0
D,G		3.5	2.5	3.5	6.0	40.0	45.5
G	3	17.0	5.0	3.0	5.0	30.0	40.5
A,G		3.0	2.5	3.0	4.5	24.5	63.0
D,G		3.0	2.5	3.0	4.5	29.0	58.0
G	7	9.5	4.0	3.0	3.5	20.5	60.0
A,G		2.5	2.0	2.5	4.0	15.0	73.5
D,G		2.5	1.5	1.5	3.5	19.0	71.5
G	14	7.0	3.5	3.0	3.0	13.5	71.0
A,G		2.5	2.0	2.0	2.0	11.0	80.5
D,G		3.5	2.5	2.5	3.5	12.0	76.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C-T-T-C-C-C-C)-5'**

Tabelle 45: Primer 14, Templat 92, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	76.5	14.0	3.0	2.0	3.0	1.5	
A,G		56.5	22.5	9.5	3.5	3.0	4.0	1.0
D,G		17.5	6.0	7.0	7.5	13.5	35.5	13.0
G	2	71.5	14.0	3.0	2.5	4.5	4.0	0.5
A,G		46.0	20.0	11.0	5.0	5.0	8.5	4.5
D,G		9.0	4.0	3.5	4.0	9.0	40.0	29.5
G	3	61.5	15.0	3.0	3.0	6.5	9.0	2.5
A,G		33.0	19.5	12.5	5.5	6.5	12.5	10.5
D,G		7.5	4.0	3.0	3.0	6.5	30.0	45.0
G	7	51.0	16.5	3.5	3.5	7.5	12.5	6.0
A,G		21.0	17.5	12.5	6.0	7.0	14.0	21.5
D,G		4.0	2.0	1.5	2.5	4.5	17.0	63.5
G	14	39.0	17.5	4.5	4.0	7.5	15.0	13.0
A,G		17.0	18.0	11.5	6.0	7.0	12.5	30.5
D,G		4.0	2.5	2.0	3.0	4.0	15.0	70.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-T-T-T.-C-C-C)-5'**

Tabelle 46: Primer 14, Templat 93, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	88.0	10.5	1.0				
A,G		68.5	26.5	4.0	1.0			
D,G		36.5	23.5	8.0	7.5	9.0	12.5	3.0
G	2	81.5	16.5	3.5	1.0			
A,G		64.5	28.5	5.0	1.0			
D,G		21.0	16.0	7.0	7.5	11.0	25.0	12.0
G	3	80.0	16.5	2.0	1.0	0.5		
A,G		55.5	33.5	8.0	2.0	0.5	0.5	
D,G		13.5	10.5	4.5	5.5	10.0	30.0	26.0
G	7	73.0	21.5	3.0	1.0	0.5	0.5	0.5
A,G		46.0	36.5	11.5	3.5	1.5	1.0	0.5
D,G		7.5	6.0	3.0	4.0	7.0	25.5	47.0
G	14	64.5	26.5	5.0	2.0	1.5	1.0	0.5
A,G		36.0	36.0	15.0	5.5	2.5	2.0	2.0
D,G		5.5	4.5	2.5	3.0	5.0	19.0	60.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-T-T-T.-T-T-T)-5'**

Tabelle 47: Primer 14, Templat 81, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
A	1	72.0	25.0	2.5				
D		40.5	28.0	18.5	9.5	3.0	1.0	
A	2	68.5	28.0	3.5	0.5			
D		27.0	23.5	21.5	16.5	7.5	3.0	1.0
A	3	60.0	32.0	6.5	1.0			
D		21.5	19.5	20.5	20.0	12.0	5.5	1.5
A	7	53.5	36.0	8.5	1.5			
D		14.5	14.5	17.5	21.5	16.0	11.0	5.0
A	14	45.5	38.0	12.5	3.0	0.5		
D		11.0	11.0	14.0	19.0	19.0	16.0	10.0

## 7.4.1.5 Einbau von G und U

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-D-C-C.-C)-5'**

Tabelle 48: Primer 14, Templat 89, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	86.0	10.5	2.5	1.0	1
U,G		83.0	12.0	2.5	1.5	
G	2	83.0	13.5	2.5	1.0	3.0
U,G		76.0	15.0	3.5	2.5	
G	3	78.5	16.0	3.5	2.0	0.5
U,G		70.0	17.0	4.5	3.5	5.0
G	7	71.0	21.5	4.0	2.5	0.5
U,G		51.0	23.0	6.0	5.0	10.0
G	14	64.0	26.5	5.0	3.5	1.5
U,G		43.5	23.0	9.0	6.0	18.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-D-D-C.-C-C)-5'**

Tabelle 49: Primer 14, Templat 90, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	89.5	9.5	1.0	0.5		
U,G		85.5	13.0	1.5			
G	2	84.0	14.0	1.5	0.5		
U,G		81.0	16.5	2.0			
G	3	80.0	17.5	2.0	0.5	0.5	0.5
U,G		76.5	19.5	3.0	1.0		
G	7	71.0	25.0	3.0	1.0	1.0	1.0
U,G		65.5	27.0	4.5	1.5		
G	14	62.5	31.5	4.5	1.0	0.5	10.0
U,G		50.5	28.5	7.0	2.0	1.5	

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-D-D-D.-D-D-D)-5'**

Tabelle 50: Primer 14, Templat 88, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
U	1	96.5	3	0.5				
U	2	93.5	6.0	0.5				
U	3	93.5	5.5	1.0				
U	7	90.0	9.0	1.0				
U	14	87.5	10	2.5				

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-A-C-C.-C-C)-5'**

Tabelle 51: Primer 14, Templat 95, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	73.0	12.0	2.5	7.0	5.0	0.5
U,G		76.5	12.5	2.5	5.5	2.5	
G	2	70.0	13.5	2.0	5.5	7.5	1.0
U,G		67.5	16.5	3.5	6.0	6.0	1.0
G	3	66.0	16.0	2.5	5.0	9.5	1.5
U,G		63.0	18.5	3.5	5.5	7.5	2.0
G	7	56.5	22.0	3.5	4.5	10.5	3.5
U,G		51.0	24.0	5.0	5.0	10.0	5.0
G	14	53.0	25.5	3.5	3.5	10.5	4.0
U,G		40.0	28.0	7.0	5.0	10.5	8.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-A-A-C.-C-C-C)-5'**

Tabelle 52: Primer 14, Templat 96, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	87.0	11.0	1.0	1.0		
U,G		89.0	10.0	1.0			
G	2	81.0	16.0	1.5	1.0	0.5	
U,G		82.0	16.0	1.5	0.5		
G	3	76.0	20.0	1.5	1.0	1.0	0.5
U,G		77.0	20.0	2.0	0.5	0.5	
G	7	64.0	29.0	3.0	1.5	2.0	1.0
U,G		66.0	28.0	4.0	1.0	1.0	0.5
G	14	56.5	34.0	4.0	2.0	2.0	2.0
U,G		56.0	33.5	6.0	2.0	1.5	1.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-A-A-A.-C-C-C)-5'**

Tabelle 53: Primer 14, Templat 97, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	92.0	7.5	0.5			
U,G		92.5	7.5	0.5			
G	2	89.0	10.5	0.5			
U,G		88.5	11.0	0.5			
G	3	85.5	13.0	1.0			
U,G		84.5	14.0	1.5			
G	7	78.0	20.0	2.0	0.5		
U,G		77.0	21.0	2.0			
G	14	70.5	25.0	4.5	2.0		
U,G		69.0	27.0	4.0	0.5		

### 7.4.1.6 Einbau von drei unterschiedlichen Imidazoliden

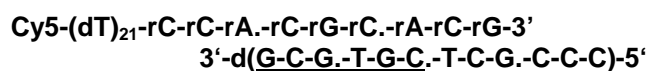


Tabelle 54: Primer 14, Templat 34, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,A,U	1	63.5	26.5	7.5	2.5	0.5		
G,C,D,U		55.0	24.0	13.5	5.5	1.5	0.5	
G,C,A,U	2	52.5	29.5	11.5	5.5	1.0		
G,C,D,U		44.5	24.5	17.5	11.0	2.5	0.5	
G,C,A,U	3	45.5	31.0	14.0	8.0	2.0	0.5	
G,C,D,U		34.0	24.0	19.0	15.0	4.0	3.0	1.5
G,C,A,U	7	33.0	29.5	16.5	13.5	4.5	2.0	1.5
G,C,D,U		24.5	22.5	19.5	22.0	6.5	3.0	2.0
G,C,A,U	14	28.0	27.0	17.0	16.0	6.0	3.0	2.5
G,C,D,U		19.0	19.0	17.5	25.0	9.5	5.0	5.5

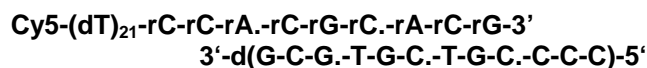


Tabelle 55: Primer 14, Templat 35, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,A,U	1	52.0	27.5	16.0	4.0	1.0	0.5	
G,C,D,U		45.5	24.0	24.5	4.0	1.0	0.5	
G,C,A,U	2	40.5	26.0	22.0	8.0	2.5	1.0	0.5
G,C,D,U		32.5	20.5	33.0	8.0	3.5	2.0	0.5
G,C,A,U	3	33.0	25.0	24.5	11.0	3.5	2.0	1.0
G,C,D,U		24.0	18.0	35.5	12.0	5.0	3.5	1.5
G,C,A,U	7	22.5	20.5	24.5	16.5	7.0	5.0	4.0
G,C,D,U		15.5	14.0	34.5	16.5	8.0	6.5	5.0
G,C,A,U	14	18.0	17.5	22.5	19.0	9.0	6.5	7.5
G,C,D,U		11.0	11.5	30.0	18.5	9.5	9.0	10.5

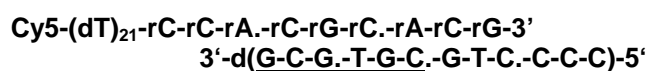


Tabelle 56: Primer 14, Templat 36, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,A,U	1	62.5	27.0	9.5	1.5	0.5		
G,C,D,U		63.0	25.5	8.0	2.0	1.0	0.5	
G,C,A,U	2	50.0	30.5	15.0	3.5	1.0	0.5	
G,C,D,U		51.5	29.0	12.5	3.5	2.0	1.5	0.5
G,C,A,U	3	43.0	31.5	17.5	5.5	1.5	0.5	0.5
G,C,D,U		39.5	30.5	17.0	5.5	3.0	2.5	1.0
G,C,A,U	7	29.5	30.5	22.0	10.0	4.0	2.0	1.5
G,C,D,U		26.0	29.5	21.0	9.0	5.5	4.5	4.0
G,C,A,U	14	22.0	30.0	23.0	12.5	5.5	3.0	3.0
G,C,D,U		17.0	27.5	22.5	12.0	7.5	6.5	8.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-G-C-T.-C-C-C)-5'**

Tabelle 57: Primer 14 und Templat 37, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,A,U	1	73.5	23.0	3.0	1.0			
G,C,D,U		80.0	16.5	2.5	1.0	0.5		
G,C,A,U	2	64.5	28.5	5.0	1.5			
G,C,D,U		65.0	25.5	4.5	2.0	2.0	1.0	
G,C,A,U	3	58.0	33.0	6.5	2.0	0.5		
G,C,D,U		57.0	29.0	6.5	3.0	2.5	2.0	0.5
G,C,A,U	7	52.5	34.5	9.5	2.5	1.0	0.5	
G,C,D,U		42.5	33.0	10.5	4.5	4.0	3.5	2.0
G,C,A,U	14	38.0	41.5	14.5	4.5	2.0	1.5	1.0
G,C,D,U		34.5	35.5	13.0	5.0	4.0	4.5	4.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-A-G-C.-C-C)-5'**

Tabelle 58: Primer 14, Templat 38, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,A,U	1	83.0	15.5	2.0				
G,C,D,U		89.5	10.5					
G,C,A,U	2	76.5	21.0	2.5				
G,C,D,U		79.0	19.5	2.0				
G,C,A,U	3	70.0	25.5	4.0	0.5			
G,C,D,U		68.0	26.5	5.0	0.5			
G,C,A,U	7	57.0	32.0	8.5	2.0	0.5		
G,C,D,U		56.5	32.5	8.5	2.0	0.5	0.5	
G,C,A,U	14	45.0	37.0	12.5	3.5	1.5	0.5	
G,C,D,U		47.0	37.5	11.0	3.5	1.0	0.5	

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-A-T-C.-C-C)-5'**

Tabelle 59: Primer 14, Templat 39, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,A,U	1	84.0	14.5	1.0	0.5			
G,C,D,U		86.0	12.5	1.5				
G,C,A,U	2	79.5	18.5	1.5	0.5			
G,C,D,U		75.0	20.0	3.5	1.0	0.5		
G,C,A,U	3	71.5	24.5	3.5	0.5			
G,C,D,U		67.5	24.5	5.0	1.5	1.0	0.5	
G,C,A,U	7	59.5	31.5	7.0	1.5	0.5		
G,C,D,U		52.0	31.0	8.5	3.5	2.5	2.0	0.5
G,C,A,U	14	50.5	35.0	9.5	4.0	1.5	0.5	
G,C,D,U		44.5	34.0	10.5	3.5	3.5	3.0	1.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-T-G-A.-G-C-C.-G)-5'**

Tabelle 60: Primer 14, Templat 40, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,A,U	1	88.5	12.0					
G,C,D,U		94.0	6.0					
G,C,A,U	2	86.0	14.0					
G,C,D,U		87.0	12.5	1.0				
G,C,A,U	3	82.5	17.5					
G,C,D,U		79.5	16.5	3.0	1.0			
G,C,A,U	7	71.0	23.5	5.5				
G,C,D,U		71.5	24.0	3.5	0.5			
G,C,A,U	14	63.5	26.0	10.5				
G,C,D,U		66.0	26.0	7.5	1.0			

#### 7.4.1.7 Zufallseinbau

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-[C/T]-C-C.-C-C)-5'**

Tabelle 61: Primer 14, Templat 27, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	3.5	2.5	3.0	4.4	31.5	55.0
D		88.0	12.0				
G,D		3.5	2.5	2.5	5.5	42.0	44.0
G,A,C,U		7.0	10.5	14.0	24.0	32.5	12.0
G,D,C,U		6.5	6.0	5.5	15.0	40.0	27.0
G	2	2.0	2.0	1.0	3.0	18.0	74.0
D		80.0	18.0	2.0			
G,D		2.5	2.5	2.5	5.0	26.0	61.0
G,A,C,U		5.0	6.0	7.5	15.5	37.5	28.5
G,D,C,U		4.0	3.0	4.0	8.0	35.5	46.0
G	3	2.5	1.5	2.5	2.5	14.5	76.5
D		77.5	20.5	2.0			
G,D		2.5	3.0	2.5	4.0	21.5	67.0
G,A,C,U		5.0	5.0	6.0	12.5	33.5	38.5
G,D,C,U		3.5	2.5	3.0	5.5	28.5	57.5
G	7	2.5	2.5	1.5	2.5	8.5	83.0
D		69.0	27.0	4.0	0.5		
G,D		2.5	2.5	2.0	4.0	13.0	76.0
G,A,C,U		4.5	5.0	4.0	7.0	29.0	50.5
G,D,C,U		2.5	2.0	2.5	3.5	17.5	72.0
G	14	2.5	2.5	2.0	2.0	8.0	84.0
D		60.0	32.0	6.5	1.0	0.5	
G,D		2.0	2.5	1.5	2.5	9.5	82.0
G,A,C,U		4.0	3.5	3.0	6.0	17.0	66.5
G,D,C,U		2.5	2.5	1.5	3.5	11.5	79.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-[C/T]-C.-C-C)-5'**

Tabelle 62: Primer 14, Templat 52, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	9.5	13.5	45.0	10.0	12.5	26.0
D		88.5	11.5				
G,D		4.5	2.5	2.5	12.0	10.0	65.0
G,D,C,U		12.5	18.0	12.0	21.0	14.5	17.5
G	2	5.0	5.5	35.0	9.5	11.0	33.5
D		86.0	13.0	1.0			
G,D		3.0	1.5	1.5	8.5	7.0	74.5
G,D,C,U		7.0	9.0	8.0	18.5	9.5	38.5
G	3	4.0	5.0	27.5	10.0	10.5	43.0
D		84.5	15.0	1.0			
G,D		3.5	1.5	1.5	9.0	6.5	73.5
G,D,C,U		7.0	5.5	5.0	14.5	11.5	50.5
G	7	3.0	4.0	12.5	7.5	8.0	61.0
D		76.5	19.5	2.5	0.5	0.5	0.5
G,D		3.0	1.5	1.5	7.0	4.5	77.5
G,D,C,U		3.5	3.5	3.5	10.0	8.5	67.0
G	14	3.0	4.0	12.5	7.0	7.0	63.5
D		71.5	23.5	3.5	1.0	0.5	0.5
G,D		3.0	2.0	2.0	7.0	4.0	78.0
G,D,C,U		3.5	3.5	3.0	7.5	6.5	71.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-[C/T]-[C/T].C-C-C)-5'**

Tabelle 63: Primer 14, Templat 53, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	3.5	3.0	2.0	5.0	36.0	47.0	3.5
D		93.5	6.5					
G,D		3.0	2.0	2.5	7.0	46.0	36.5	3.5
G,D,C,U		5.5	5.5	9.0	18.0	39.5	20.5	3.0
G	2	3.0	2.5	1.5	3.0	22.0	61.5	6.5
D		88.5	10.5	0.5				
G,D		3.0	1.5	2.0	5.0	31.0	50.0	8.0
G,D,C,U		3.5	3.5	6.0	15.0	39.0	30.0	3.5
G	3	2.5	2.0	1.5	3.0	16.5	65.0	10.0
D		85.0	13.5	1.0				
G,D		2.5	1.5	2.0	4.0	24.5	53.0	12.5
G,D,C,U		3.0	3.0	5.0	12.0	35.0	37.0	6.0
G	7	2.0	1.5	1.5	2.0	10.0	63.0	20.0
D		79.5	18.5	2.0				
G,D		3.0	2.0	2.0	4.5	14.0	51.5	23.0
G,D,C,U		3.0	2.5	4.0	7.0	24.0	44.5	15.0
G	14	3.0	2.0	2.0	3.0	8.0	53.5	29.0
D		71.5	22.0	4.0	1.0	0.5	0.5	
G,D		2.0	1.5	1.5	2.5	11.0	47.5	37.5
G,D,C,U		2.5	2.0	3.0	6.0	17.5	44.0	25.5



**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C.-C-[C/T]-[C/T].-[C/T]-C-C-C)-5'**

Tabelle 64: Primer 14, Templat 65, Konz. Imidazole je 50 mM

MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	6.5	13.5	29.0	16.5	19.0	14.0	0.5	
D		92.5	6.5	0.5	0.5				
G,D		13.0	24.0	18.5	13.0	22.5	9.0	0.5	
C,G,D,U		23.0	34.0	21.5	11.5	7.5	2.0		
G	2	6.0	9.0	23.5	19.5	17.5	22.5	2.0	
D		89.5	8.5	1.0	1.0	0.5			
G,D		7.5	14.0	16.0	12.5	27.0	21.0	2.0	
C,G,D,U		12.5	26.0	23.5	16.0	14.5	7.0	1.0	
G	3	5.0	7.5	20.5	20.0	17.0	26.5	3.0	
D		88.0	9.0	1.5	1.0	0.5			
G,D		6.5	9.5	14.5	12.5	25.5	28.5	3.5	
C,G,D,U		10.0	19.5	22.0	17.5	17.5	11.5	2.0	1.0
G	7	4.0	4.0	14.0	18.5	16.5	35.0	7.5	0.5
D		84.5	12.0	1.5	1.0	0.5			
G,D		6.0	6.5	12.0	11.5	19.5	36.5	9.5	1.0
C,G,D,U		5.5	12.0	18.0	17.5	19.0	22.0	5.5	1.0
G	14	3.5	4.0	11.0	16.0	15.0	36.0	12.5	2.0
D		81.0	15.5	2.5	1.0	0.5			
G,D		4.0	4.5	7.5	8.5	14.5	40.0	17.0	2.5
C,G,D,U		5.5	10.0	15.5	15.5	16.5	37.5	9.5	2.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C.-C-[A/C/G/T]-C.-C-C)-5'**

Tabelle 65: Primer 14, Templat 54, Konz. Imidazole je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	5.0	6.0	12.0	5.0	7.0	65.5
D		91.0	9.0				
G,D		5.0	3.0	3.5	7.5	9.5	70.0
G,C		6.0	10.5	9.5	5.5	9.0	55.0
G,D,C,U		13.5	17.5	11.5	12.0	10.0	36.0
G	2	3.5	4.0	7.5	4.0	6.0	75.5
D		85.0	13.5	2.0			
G,D		3.0	1.5	1.5	3.0	7.0	84.0
G,C		5.0	7.0	11.5	4.5	6.5	65.0
G,D,C,U		7.5	8.5	10.0	10.0	15.0	45.5
G	3	4.5	4.5	7.0	5.0	6.0	73.0
D		80.0	16.5	3.0	1.0		
G,D		3.0	1.5	1.0	1.5	5.5	87.5
G,C		4.5	5.5	9.5	5.0	6.0	69.5
G,D,C,U		5.5	8.5	8.5	8.5	14.0	55.0
G	7	3.5	3.0	4.0	3.5	5.5	80.5
D		75.5	20.5	3.5	0.5	0.5	
G,D		2.5	1.5	1.0	3.0	4.0	87.5
G,C		3.5	4.5	7.0	5.5	5.5	74.5
G,D,C,U		3.5	5.0	5.5	5.5	9.5	67.5
G	14	3.5	3.0	3.5	4.0	5.0	81.0
D		69.5	24.5	4.5	1.0	0.5	
G,D		3.0	2.0	1.5	2.5	4.5	87.0
G,C		3.0	4.0	5.5	4.5	5.0	78.0
G,D,C,U		3.0	5.0	5.0	5.0	7.5	76.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T].-C-C-C)-5'**

Tabelle 66: Primer 14, Templat 57, Konz. Imidazolide 50 mM

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	16.5	29.5	16.0	5.5	7.0	14.0	11.5
D		91.5	8.0	0.5				
G,D		9.5	19.0	13.5	6.0	7.5	26.0	18.5
C,G		20.0	28.0	16.0	8.0	8.0	13.0	6.5
C,D,G,U		31.5	27.0	13.0	9.0	8.5	8.5	2.5
G	2	10.5	23.0	17.5	6.0	6.	17.0	19.5
D		89.0	10.5	1.0				
G,D		7.0	13.5	13	5.5	6.0	23.0	32.0
C,G		11.5	21.0	16.5	9.0	9.5	17.5	14.5
C,D,G,U		18.5	23.0	14.0	10.0	11.0	15.0	9.0
G	3	7.5	19.0	17.0	6.5	6.0	18.0	25.5
D		87.5	11.5	1.0				
G,D		6.0	10.5	12.5	5.5	6.0	20.5	39.5
C,G		9.0	16.5	16.0	9.0	9.0	19.0	21.5
C,D,G,U		13.0	19.5	14.0	10.5	11.0	17.5	14.0
G	7	6.0	12.5	16.0	6.5	5.5	15.	39.5
D		81.0	18.0	1.0				
G,D		5.0	7.0	10.0	5.0	5.5	14.5	52.5
C,G		5.5	10.5	14.0	9.0	8.0	17.0	36.0
C,D,G,U		6.5	13.5	12.0	9.0	9.5	19.0	31.0
G	14	5.5	9.5	13.0	7.0	5.5	12.5	47.5
D		74.5	22.0	3.5	0.5			
G,D		5.0	6.5	9.5	6.0	4.5	11.5	57.0
C,G		5.5	8.0	12.5	9.0	7.0	13.5	44.5
C,D,G,U		6.0	11.0	12.0	8.5	8.5	14.5	40.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-C)-5'**

Tabelle 67: Primer 14, Templat 70, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	19.5	48.5	20.5	5.0	4.0	2.5
D		94.0	6.0				
G,D		32.0	35.5	17.0	6.5	7.0	2.0
G,C		25.0	42.5	34.0	4.5	3.0	1.5
C,G,D,U		44.0	36.0	14.0	4.0	2.0	0.5
G	2	13.0	43.0	37.0	8.0	4.0	4.5
D		91.5	8.5				
G,D		19.5	29.0	20.5	10.0	13.5	7.5
G,C		15.5	37.0	33.0	9.0	3.5	3.0
C,G,D,U		29.5	35.5	21.0	8.0	4.0	1.5
G	3	11.0	34.0	33.0	10.5	5.0	6.5
D		88.0	12.0				
G,D		14.5	24.5	21.5	11.5	15.5	13.0
G,C		12.0	31.0	37.5	12.0	4.0	4.0
C,G,D,U		25.0	31.5	23.0	11.0	6.0	3.0
G	7	8.0	26.5	34.0	14.0	5.5	8.5
D		83.0	15.5	1.5			
G,D		10.5	16.5	19.0	12.5	15.5	26.0
G,C		7.0	22.0	40.0	18.5	5.5	7.5
C,G,D,U		13.5	24.5	26.5	16.5	10.0	8.5
G	14	7.0	23.5	33.5	17.5	7.0	12.0
D		77.0	19.5	2.5	0.5		
G,D		7.0	13.5	18.0	13.0	13.5	35.0
G,C		6.5	16.5	37.0	23.0	7.5	9.0
C,G,D,U		10.5	19.5	25.0	18.5	11.5	15.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T])-5'**

Tabelle 68: Primer 14, Templat 78, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3+4
G	1	61.0	27.5	10.0	2.0
D		89.5	9.5	1.0	
C,G,D,U		67.5	23.5	7.5	2.0
G	2	52.5	30.5	14.0	3.5
D		84.5	13.5	2.0	
C,G,D,U		56.5	28.0	11.5	4.0
G	3	47.5	31.5	16.0	5.0
D		82.0	15.5	2.0	
C,G,D,U		48.5	30.0	14.5	7.0
G	7	38.5	33.5	20.0	8.0
D		74.0	21.0	4.0	1.0
C,G,D,U		36.5	31.5	18.5	12.5
G	14	32.5	32.5	22.5	11.5
D		68.5	24.0	7.0	1.0
C,G,D,U		29.0	35.5	20.5	20.0
G	28	25.5	33.0	24.0	17.5
D					
C,G,D,U		22.5	28.5	21.5	27.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C.-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T])-5'**

Tabelle 69: Primer 14, Templat 79, Konz. Imidazolid 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	60.0	28.5	9.5	2.0	0.0
D		89.0	10.0	1.0		
G,D		71.5	20.5	6.0	1.5	0.5
C,G,D,U		67.0	24.0	7.0	1.5	0.5
G	2	51.5	30.0	14.0	3.5	1.0
D		85.0	13.5	2.0		
G,D		60.5	24.5	10.5	4.0	1.0
C,G,D,U		54.0	30.0	12.0	3.5	1.0
G	3	43.5	29.0	15.5	4.5	1.5
D		81.0	16.0	3.0	0.5	
G,D		53.5	25.5	12.5	6.0	2.0
C,G,D,U		47.0	30.0	15.0	5.5	2.0
G	7	37.0	33.0	20.5	7.0	2.5
D		73.5	21.0	4.5	1.0	
G,D		40.5	27.0	18.0	10.0	4.5
C,G,D,U		34.0	31.0	20.0	9.0	5.5
G	14	31.0	32.0	23.0	9.5	2.5
D		66.0	19.5	6.5	2.0	0.5
G,D		32.0	26.5	20.0	12.5	9.5
C,G,D,U		26.5	30.0	17.5	11.5	10.0
G	28	21.5	31.5	26.5	13.5	7.0
D						
G,D						
C,G,D,U		20.5	28.5	23.5	14.0	13.5

## 7.4.2 Standard „GCACG“ Primer aus DNA

### 7.4.2.1 Einbau von G

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-dG-dC-dA-dC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C.-C-C-C.-C-C-C)-5'**

Tabelle 70: Primer 20, Templat 28, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	18.0	5.0	3.0	3.5	6.0	38.0	26.5
G	2	15.5	5.5	3.0	3.0	4.5	26.0	42.5
G	3	17.0	6.0	2.5	2.0	3.5	20.0	49.0
G	7	15.5	5.0	2.0	1.4	2.5	11.0	62.0
G	14	14.0	3.5	2.0	2.0	3.0	8.5	67.0
G	28	14.5	3.5	2.5	3.0	3.5	7.0	66.0

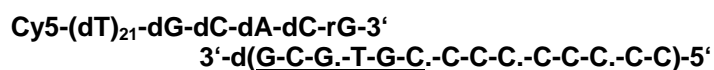


Tabelle 71: Primer 20, Templat 29, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G	1	18.0	6.0	6.0	7.0	5.0	4.5	6.0	28.5	19.0
G	2	16.5	6.0	6.0	6.5	4.5	4.0	4.5	17.5	34.0
G	3	15.5	6.0	6.0	6.5	4.0	3.5	4.5	16.0	38.5
G	7	16.0	7.0	5.5	5.5	3.5	3.0	4.0	9.5	45.5
G	14	13.5	5.5	5.0	5.5	4.5	4.0	4.5	8.0	50
G	28	15.0	5.0	4.0	4.5	4.5	4.0	4.5	7.0	51.0

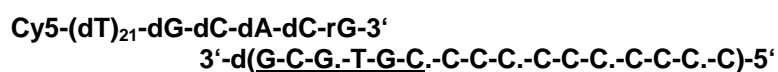


Tabelle 72: Primer 20, Templat 30, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
G	1	20.5	7.0	6.5	6.0	6.0	7.0	5.5	4.5	5.0	18.5	14.0
G	2	17.5	7.0	6.5	6.0	5.5	6.0	4.5	5.0	7.0	12.0	20.5
G	3	17.5	7.0	6.5	6.0	5.5	6.0	4.5	3.5	4.5	11.0	28.5
G	7	17.0	6.0	6.5	6.5	6.0	6.0	3.5	3.0	4.0	8.0	34.0
G	14	16.0	6.0	6.0	6.5	6.0	5.5	3.0	3.0	4.0	6.5	36.5
G	28	12.5	5.0	5.5	6.5	6.5	5.5	3.5	3.5	4.5	6.5	41.0

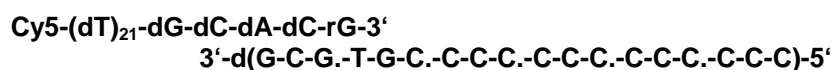


Tabelle 73: Primer 20, Templat 31, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+13
G	1	21.0	8.0	8.0	8.0	7.0	6.5	6.5	6.5	5.5	4.5	4.5	9.0	5.5
G	2	19.5	7.5	8.0	8.0	6.5	6.0	6.0	6.0	5.5	4.5	4.5	8.0	9.5
G	3	18.5	7.0	7.5	8.0	6.5	6.0	6.0	6.0	5.0	5.0	5.0	8.0	13.0
G	7	18.5	6.5	7.0	8.0	7.0	6.0	6.5	5.5	4.5	4.5	4.5	6.5	15.5
G	14	16.5	6.0	7.0	8.5	8.0	6.5	6.0	5.5	4.5	4.5	4.5	6.0	17.0
G	28	13.5	5.5	6.5	8.0	8.5	7.0	6.0	5.5	4.5	4.5	5.0	6.0	19.0

## 7.4.2.2 Einbau von G und A/D

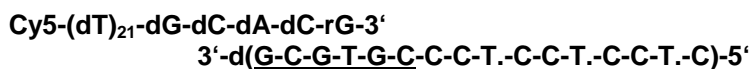


Tabelle 74: Primer 20, Templat 19, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10+11
G	1	38.0	26.0	31.0	3.5	1.5	0.5					
G,D		52.0	12.0	5.5	12.0	5.0	2.0	5.5	3.5	1.5	1.5	0.5
G	2	25.5	15.0	42.0	8.0	5.0	3.5	0.5				
G,D		48.0	9.0	4.0	11.0	3.5	2.5	6.5	4.5	3.0	4.5	4.0
G	3	21.5	13.5	40.0	10.0	7.0	6.5	1.0	0.5			
G,D		39.0	10.0	7.0	12.0	5.0	3.5	5.5	3.0	3.0	4.5	8.5
G	7	12.5	5.0	36.0	12.5	9.5	16.5	4.0	2.5	1.0		
G,D		36.0	9.0	10.5	10.0	2.5	2.0	5.5	3.0	3.0	6.0	12.5
G	14	7.5	2.0	35.0	11.5	8.0	19.0	5.5	4.0	3.0	0.5	
G,D		34.5	8.0	5.5	7.5	2.5	3.5	4.5	3.0	4.0	8.5	14.5



Tabelle 75: Primer 20, Templat 20, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12+13
G	1	42.5	24.0	29.5	3.0	1.0	0.5							
G,D		56.0	8.5	3.5	12.0	4.5	2.0	5.5	3.0	1.0	2.0	1.5	0.5	
G	2	32.0	15.0	39.0	6.5	4.0	3.0	0.5						
G,D		48.5	7.0	3.5	11.5	3.5	3.0	7.5	3.0	1.5	3.5	4.5	2.0	0.5
G	3	30.0	12.0	38.5	8.0	5.0	5.0	1.0	0.5	0.5				
G,D		47.0	8.5	3.0	11.0	3.0	2.0	6.0	2.5	1.5	3.5	6.0	5.0	2.0
G	7	18.5	6.5	36.5	10.5	7.5	13.0	3.0	2.5	2.0	0.5			
G,D		37.0	7.5	4.0	11.5	3.5	2.5	6.5	3.0	2.0	3.0	5.5	8.0	6.0
G	14	12.0	4.0	31.0	11.5	8.0	18.0	5.5	4.0	5.0	1.0	0.5		
G,D		35.0	7.0	4.0	11.0	3.5	3.0	6.0	2.5	2.0	2.5	5.0	9.5	9.5
G	28													
G,D		32.5	7.0	4.5	11.0	4.0	3.0	6.0	2.5	2.0	2.5	4.0	8.5	12.0

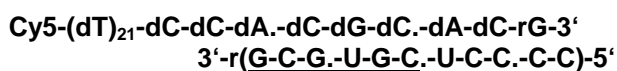


Tabelle 76: Primer 14, Templat 102, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	50.5	10.0	6.0	7.0	19.5	7.0
D,G		13.5	7.0	5.0	5.5	44.5	24.5
G	2	31.5	8.0	5.5	6.5	27.5	21.0
D,G		9.5	6.0	4.5	4.0	42.0	34.0
G	3	25.0	7.0	5.5	6.0	30.0	26.5
D,G		9.0	6.0	5.0	4.5	35.5	40.0
G	7	15.5	7.0	5.0	4.5	24.5	43.5
D,G		8.0	6.0	4.5	4.0	20.5	57.0
G	14	10.5	6.0	5.0	4.0	17.0	57.5
D,G		8.0	6.5	4.5	4.5	15.0	61.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rA.-rC-rG-rC.-rA-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-U-U-C.-C-C-C)-5'**

Tabelle 77: Primer 14, Templat 103, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	80.0	10.5	4.0	2.0	2.0	1.5	
D,G		21.5	13.5	7.0	10.5	10.5	26.5	10.5
G	2	75.5	11.0	3.5	2.5	3.0	2.5	2.0
D,G		15.0	12.0	6.5	10.0	9.5	35.0	12.0
G	3	68.5	11.0	5.5	3.0	3.5	4.5	4.0
D,G		13.5	11.0	6.5	8.0	9.0	20.5	31.5
G	7	62.5	11.0	6.0	5.0	4.0	6.0	4.5
D,G		12.0	10.0	6.5	7.0	7.0	14.0	43.5
G	14	53.0	12.0	6.0	5.5	6.0	8.0	9.5
D,G		11.5	9.5	6.5	6.5	6.5	11.5	48.0

### 7.4.2.3 Zufallseinbau

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-dG-dC-dA-dC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G.-T-G-C.-C-[C/T]-[C/T].-C-C-C)-5'**

Tabelle 78: Primer 20, Templat 53, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	42.0	12.0	6.0	5.0	18.5	13.0	4.0
G,D		51.5	8.5	7.0	10.0	14.0	7.5	1.5
G,D,C,U		67.0	16.0	7.5	7.5	3.0	1.5	0.5
G	2	37.0	10.5	5.5	4.0	16.0	20.0	7.5
G,D		42.0	7.0	6.0	7.5	17.5	15.0	5.0
G,D,C,U		60.0	12.5	8.0	7.5	7.0	4.0	1.0
G	3	30.0	10.5	5.0	3.5	15.0	25.5	10.5
G,D		36.0	6.5	5.0	6.5	19.0	19.0	8.0
G,D,C,U		56.5	12.0	8.0	8.0	8.0	8.5	2.0
G	7	28.0	10.0	5.0	3.5	9.5	28.5	15.0
G,D		27.5	6.0	5.0	5.5	15.0	25.0	16.0
G,D,C,U		48.5	11.5	8.0	8.0	9.5	9.0	5.5
G	14	23.0	9.5	5.5	3.5	7.0	29.0	23.0
G,D		24.5	6.5	4.5	4.5	11.0	26.5	22.5
G,D,C,U		41.0	11.5	8.0	7.5	9.5	12.0	10.5
G	28	20.5	10.5	5.0	4.5	7.0	21.5	30.5
G,D		22.5	7.0	4.5	3.5	4.5	29.5	28.5
G,D,C,U		37.5	11.0	7.5	5.5	6.0	8.5	23.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-dG-dC-dA-dC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C.-C-[A/C/G/T]-C.-C-C)-5'**

Tabelle 79: Primer 20, Templat 54, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	51.0	16.0	8.5	2.5	3.5	18.0
G,D		59.0	11.5	5.5	5.5	7.0	12.0
G,D,C,U		71.5	23.5	6.0	3.5	2.0	1.0
G	2	46.0	15.5	9.5	2.5	2.5	24.0
G,D		50.0	9.0	4.5	5.0	7.0	24.5
G,D,C,U		69.0	13.5	6.0	4.5	4.0	4.0
G	3	39.0	15.0	10.0	3.0	3.0	30.5
G,D		44.5	7.5	4.0	4.5	6.5	32.5
G,D,C,U		63.5	13.5	6.5	5.5	5.0	6.0
G	7	32.0	13.5	9.5	4.0	3.5	37.5
G,D		36.5	7.5	4.5	4.5	5.5	42.0
G,D,C,U		55.0	13.0	7.5	6.0	6.0	13.0
G	14	29.0	13.0	9.5	4.5	3.5	40.5
G,D		29.0	8.5	5.0	4.0	4.5	49.5
G,D,C,U		45.5	13.5	8.0	6.0	6.0	6.0

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-dG-dC-dA-dC-rG-3'**  
**3'-d(G-C-G-T-G-C.-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T].-C-C-C)-5'**

Tabelle 80: Primer 20, Templat 57, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	65.0	19.0	6.0	1.5	1.5	5.0	2.5
G,D		74.0	12.5	4.0	1.5	2.5	3.5	1.0
G,D,C,U		81.0	13.0	3.5	1.5	1.0	0.5	
G	2	58.0	20.5	6.0	1.5	1.5	5.0	5.0
G,D		63.5	13.5	4.5	3.0	3.5	8.0	4.0
G,D,C,U		75.0	14.0	4.5	2.5	1.5	1.5	0.5
G	3	55.0	21.0	9.0	2.0	1.5	5.0	6.5
G,D		59.5	13.5	5.0	3.5	3.5	8.5	6.5
G,D,C,U		71.5	14.0	5.5	3.0	2.5	2.5	1.0
G	7	46.5	21.0	11.5	3.5	2.0	5.0	10.5
G,D		53.5	13.5	6.0	3.5	3.0	7.5	13.0
G,D,C,U		62.5	14.5	7.5	4.5	3.0	3.5	4.0
G	14	40.5	20.0	13.0	4.5	2.5	5.5	14.0
G,D		44.0	16.0	8.0	4.0	3.0	6.5	18.5
G,D,C,U		55.0	17.0	9.0	5.5	3.5	4.0	6.5



**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-dG-dC-dA-dC-rG-3'****3'-d(G-C-G-T-G-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T])-5'**

Tabelle 81: Primer 20, Templat 78, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3+4
G	1	92.5	6.5	1.0	
G,D		92.0	8.0	0.5	
G,D,C,U		91.5	8.5	0.5	
G	2	86.0	11.0	2.5	0.5
G,D		90.0	9.0	1.0	
G,D,C,U		85.5	12.5	1.5	0.5
G	3	85.5	11.5	2.5	0.5
G,D		87.5	11.0	1.5	
G,D,C,U		83.5	14.0	2.0	0.5
G	7	75.5	13.0	5.0	1.5
G,D		81.0	15.5	3.0	0.5
G,D,C,U		80.0	15.5	4.0	1.0
G	14	69.5	18.5	4.5	5.0
G,D		78.0	17.0	4.0	1.5
G,D,C,U		71.0	20.5	6.0	2.5
G	28	68.0	21.0	7.5	3.5
G,D		51.0	35.0	10.0	3.5
G,D,C,U		56.0	30.0	9.5	9.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-dG-dC-dA-dC-rG-3'****3'-d(G-C-G-T-G-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-[A/C/G/T])-5'**

Tabelle 82: Primer 20, Templat 79, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	91.5	7.5	1.0		
G,D		91.0	8.5			
G,D,C,U		90.5	9.0	0.5		
G	2	85.5	11.0	2.5		
G,D		88.5	10.5	1.5		
G,D,C,U		83.5	14.5	2.0		
G	3	83.0	13.0	3.5	0.5	
G,D		87.0	11.0	1.5		
G,D,C,U		77.5	18.5	3.5	0.5	
G	7	74.0	18.5	5.5	1.5	0.5
G,D		78.5	16.5	4.0	0.5	
G,D,C,U		75.0	18.5	5.0	1.0	0.5
G	14	71.5	19.0	6.5	2.0	1.0
G,D		76.0	17.5	5.0	1.5	0.5
G,D,C,U		68.5	21.5	7.5	2.0	0.5
G	28	64.0	24.5	8.0	2.5	1.0
G,D		58.0	30.5	8.0	2.5	1.0
G,D,C,U		55.0	30.0	10.5	3.0	1.0

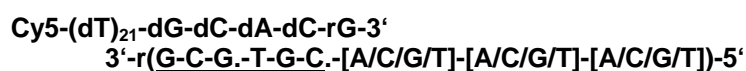


Tabelle 83: Primer 20, Templat 104, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3+4
G	1	79.5	16.0	5.5	
G,D		79.0	15.0	6.0	
G,D,C,U		77.5	14.5	7.5	0.5
G	2	64.5	22.0	10.5	3.0
G,D		62.0	21.0	9.0	8.0
G,D,C,U		61.5	17.0	14.5	7.0
G	3	57.0	22.5	17.0	3.5
G,D		57.5	20.0	9.5	12.0
G,D,C,U		55.0	20.5	16.0	8.5
G	7	53.5	21.0	20.0	6.5
G,D		52.0	19.5	11.0	17.5
G,D,C,U		47.5	19.0	15.5	18.0
G	14	50.5	20.0	22.0	7.5
G,D		49.0	19.0	12.5	19.5
G,D,C,U		45.0	16.0	16.5	22.5

### 7.4.3 „CCUUC“ Primer

#### 7.4.3.1 Einbau von G

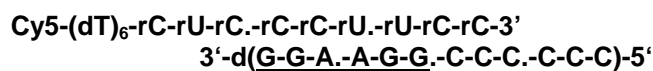


Tabelle 84: Primer 15, Templat 18, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	3.5	1.0	1.0	2.0	4.5	42.5	45.0
G,D		15.5	5.0	4.0	5.5	10.0	39.5	22.0
G,C,A,U		31.5	8.5	5.5	7.5	12.5	24.0	22.5
G	2	4.0	2.0	1.0	1.5	5.0	21.5	66.5
G,D		12.5	4.5	3.0	4.0	6.0	31.5	39.0
G,C,A,U		20.5	7.5	4.0	5.5	10.0	26.5	26.0
G	3	3.5	2.0	1.5	1.5	3.0	13.0	74.5
G,D		11.0	3.5	2.5	3.0	5.0	26.0	49.0
G,C,A,U		18.5	7.5	3.5	4.5	8.0	23.5	34.5
G	7	3.0	1.5	1.0	1.5	2.5	8.5	82.0
G,D		9.5	4.5	3.0	3.0	4.5	14.0	61.5
G,C,A,U		13.0	5.5	2.0	2.5	4.5	16.5	55.5
G	14	3.0	1.5	1.0	1.5	2.5	6.5	84.5
G,D		9.0	5.0	4.0	3.0	4.0	9.0	66.5
G,C,A,U		12	6.0	2.0	2.0	3.5	11.5	63.5

## 7.4.3.2 Einbau von G und A/D

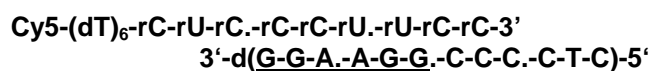


Tabelle 85: Primer 15, Templat 50, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	22.5	8.5	12.5	32.0	23.5	2.0	0.5
G,A		34.5	8.0	11.0	24.0	13.5	8.5	
G,D		28.5	4.5	5.5	11.5	19.0	32.0	
G	2	10.5	4.0	6.0	29.5	44.5	5.0	0.5
G,A		20.5	6.5	7.5	20.5	20.5	21.6	3.0
G,D		21.5	4.0	2.5	6.0	28.0	30.0	2.5
G	3	6.5	2.5	3.5	21.5	54.5	8.5	3.0
G,A		16.0	5.5	5.5	16.5	21.0	29.5	6.5
G,D		15.0	4.0	2.0	5.0	32.0	32.0	5.5
G	7	6.0	2.5	3.0	9.0	59.0	14.5	7.0
G,A		10.0	5.0	3.5	9.0	18.5	34.5	20.0
G,D		15.0	5.5	2.0	4.0	31.0	22.5	20.0
G	14	4.0	2.5	3.0	6.0	62.5	19.0	14.0
G,A		8.0	5.0	3.0	6.5	16.0	31.5	30.0
G,D		15.5	6.5	1.5	3.5	26.5	22.0	25.5

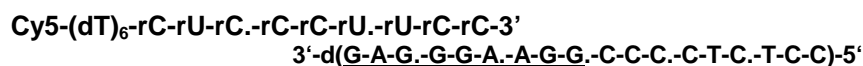


Tabelle 86: Primer 15, Templat 45, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9+10
G	1	32.5	11.5	9.5	17.5	18.5	2.5	0.5			
G,A		54.5	16.5	10.0	10.5	6.0	3.0	0.5			
G,D		45.0	14.5	9.5	8.0	11.5	5.0				
G	2	24.0	8.5	8.0	15.0	37.5	5.5	1.0			
G,A		43.5	15.0	10.0	12.0	10.0	7.5	1.5			
G,D		35.0	14.0	9.0	8.0	16.0	9.5	8.5	0.5		
G	3	20.0	5.0	7.0	13.0	42.0	8.0	2.5	0.5		
G,A		39.5	13.5	8.5	11.5	11.5	10.5	3.0	1.0		
G,D		31.0	13.5	8.5	7.5	16.5	11.5	11.5	0.5		
G	7	12.5	5.5	5.0	9.0	46.0	13.5	6.5	1.5	0.5	
G,A		29.0	13.5	8.0	10.5	14.0	14.0	7.5	3.0	1.5	
G,D		19.0	11.0	7.0	6.0	11.0	12.0	9.0	16.0	7.0	1.0
G	14	9.0	5.5	4.0	7.0	41.5	17.0	11.0	2.5	1.5	0.5
G,A		21.5	13.0	7.0	9.5	16.0	14.5	10.5	4.5	3.5	1.0
G,D		16.5	11.0	6.0	6.5	7.0	5.5	12.0	22.5	11.0	2.0

### 7.4.3.3 Einbau von drei Imidazoliden

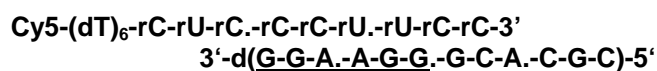


Tabelle 87: Primer 15, Templat 42, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,U	1	78.0	17.0	3.5	1.0			
G,C,U	2	70.5	23.0	8.0	1.5			
G,C,U	3	61.5	31.5	5.5	1.5			
G,C,U	7	53.5	35.5	7.5	4.5			
G,C,U	14	42.0	39.0	12.5	5.5	1.5		
G;C;U	28	36.0	41.0	17.0	4.0	1.5	0.5	

### 7.4.3.4 Zufallseinbau

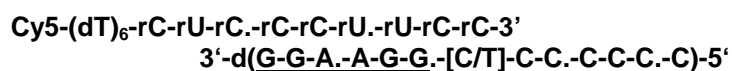


Tabelle 88: Primer 15, Templat 66, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	27.0	7.5	6.5	6.0	6.5	8.0	23.0	15.5
G,D		74.0	10.5	5.0	3.5	3.0	2.5	1.5	
G,D,C,U		81.0	9.0	3.0	2.0	2.0	2.0	1.0	
G	2	16.5	6.5	6.0	5.0	5.0	7.0	23.5	31.0
G,D		56.5	11.5	5.0	5.0	5.5	7.0	7.5	2.5
G,D,C,U		67.5	12.0	4.0	3.5	3.5	4.5	4.0	1.5
G	3	15.0	6.0	5.0	4.5	3.5	5.0	19.5	41.5
G,D		47.5	10.0	4.0	4.0	4.5	7.0	12.0	10.5
G,D,C,U		62.5	13.0	3.5	3.0	3.5	5.0	6.0	4.0
G	7	13.5	5.5	4.5	3.5	2.5	3.5	12.5	50.0
G,D		40.5	12.0	4.0	3.0	3.0	5.0	12.0	21.0
G,D,C,U		52.0	16.0	4.0	2.5	2.5	4.5	8.0	11.0
G	14	9.5	5.0	4.0	3.0	2.5	3.0	9.0	63.5
G,D		34.0	14.5	4.0	2.5	2.0	3.5	9.5	30.5
G,D,C,U		42.0	19.0	5.5	3.0	2.5	4.0	7.5	16.5
G	28	9.0	5.0	4.0	3.0	2.5	3.5	7.5	66.0
G,D		30.5	10.5	4.5	2.5	2.0	3.0	7.0	40.5
G,D,C,U		40.0	21.0	6.5	4.0	2.5	3.0	5.5	17.0

**Cy5-(dT)<sub>6</sub>-rC-rU-rC.-rC-rC-rU.-rU-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-A.-A-G-G.-[C/T]-[C/T]-C.-C-C-C.-C-C)-5'**

Tabelle 89: Primer 15, Templat 67, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G	1	47.0	11.0	4.5	4.5	3.5	3.0	5.0	15.0	6.0
G,D		66.5	9.0	6.0	3.5	6.0	5.0	3.5	0.5	
G,D,C,U		78.5	10.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	
G	2	32.5	12.5	5.0	5.0	3.5	3.5	4.5	17.0	17.0
G,D		44.0	9.5	8.0	5.0	5.0	4.5	7.5	8.0	9.5
G,D,C,U		64.0	12.5	5.0	3.0	3.0	4.0	4.5	3.5	1.0
G	3	26.5	13.0	5.5	5.5	3.0	3.0	4.0	15.0	24.5
G,D		32.5	9.5	7.5	5.5	5.5	5.5	7.5	12.0	17.0
G,D,C,U		62.5	12.5	4.0	2.5	3.0	3.5	5.0	4.5	2.0
G	7	24.5	14.0	6.0	4.5	2.5	2.0	2.5	9.0	35.5
G,D		30.0	10.5	7.5	5.0	4.5	3.5	8.0	10.0	21.0
G,D,C,U		50.5	15.5	5.5	3.0	3.5	3.5	5.5	7.5	6.5
G	14	19.0	14.5	6.0	5.0	2.5	2.5	3.0	7.0	40.0
G,D		24.0	12.0	6.0	4.0	3.5	3.5	6.5	9.5	30.0
G,D,C,U		41.5	18.5	6.5	3.5	3.5	3.0	5.0	8.0	11.5
G	28	17.5	14.5	6.5	4.5	2.5	2.0	2.5	6.0	44.0
G,D		21.0	11.5	6.0	5.0	5.0	3.0	5.5	12.0	31.5
G,D,C,U										

**Cy5-(dT)<sub>6</sub>-rC-rU-rC.-rC-rC-rU.-rU-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-A.-A-G-G.-[A/C/G/T]-C-C.-C-C-C.-C)-5'**

Tabelle 90: Primer 15, Templat 71, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	56.0	7.0	4.0	3.5	3.5	4.5	12.5	9.0
G,D		81.5	8.8	2.5	1.5	1.5	2.0	2.0	0.5
G,C		53.0	10.5	4.0	3.5	4.0	6.0	13.0	6.5
G,D,C,U		88.5	8.8	1.5	0.5	0.5			
G	2	43.0	8.0	4.0	3.5	3.5	5.0	14.0	19.0
G,D		71.0	15.0	3.0	2.5	2.5	3.0	5.5	2.5
G,C		36.5	12.0	4.5	3.5	4.0	5.5	16.5	18.0
G,D,C,U		74.5	16.0	4.0	2.0	1.5	1.5	1.5	
G	3	53.5	8.5	4.5	3.5	3.5	4.0	14.0	26.0
G,D		61.0	10.0	3.5	2.5	2.5	4.0	8.0	8.5
G,C		31.5	12.0	4.5	3.0	3.5	5.5	15.0	25.0
G,D,C,U		73.0	15.0	4.0	2.5	2.0	2.0	1.5	1.5
G	7	30.5	9.5	4.0	3.0	2.5	4.0	11.0	34.5
G,D		55.5	15.0	3.5	2.0	2.0	3.0	7.5	12.0
G,C		20.5	12.5	4.5	3.5	3.0	4.5	11.5	40.5
G,D,C,U		61.5	20.0	4.5	2.5	2.0	2.5	3.5	4.0
G	14	26.5	10.5	4.5	3.5	3.0	4.0	9.0	39.0
G,D		49.0	16.5	3.5	2.0	1.5	2.5	5.5	18.5
G,C		16.0	13.0	5.0	3.5	3.0	4.0	9.0	46.5
G,D,C,U		53.0	24.5	5.5	3.5	2.0	2.5	3.0	5.0
G	28	25.0	11.5	4.5	2.0	2.5	3.5	7.5	42.5
G,D		46.0	20.5	4.5	2.0	1.5	2.5	4.5	18.5
G,C		14.0	13.0	5.5	3.5	3.5	4.0	8.0	48.5
G,D,C,U		45.5	26.5	8.0	3.5	2.0	2.0	4.5	7.5

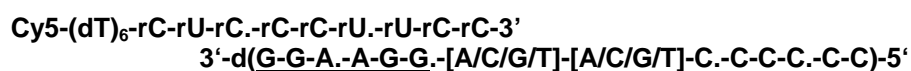


Tabelle 91: Primer 15, Templat 72, Konz. Imidazolid: je 50 mM

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G	1	78.5	9.0	2.0	1.5	0.5	1.0	1.5	4.0	2.0
G,D		84.0	10.0	2.0	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	
G,D,C,U		86.5	9.5	1.0	0.5	0.5	1.5			
G	2	65.0	16.0	4.0	2.0	1.0	1.0	1.5	4.5	5.0
G,D		75.0	12.5	3.0	1.5	1.0	1.5	2.5	2.5	1.5
G,D,C,U		81.0	13.5	2.5	1.0	0.5	1.5			
G	3	64.0	15.0	3.5	2.5	1.5	1.5	2.0	4.0	6.0
G,D		64.0	16.0	3.5	2.0	1.5	1.5	2.5	5.0	5.0
G,D,C,U		77.0	16.0	3.5	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
G	7	53.0	21.0	4.0	2.5	1.0	1.0	1.5	4.0	12.0
G,D		61.5	19.0	4.0	2.0	1.5	1.0	2.0	4.0	5.0
G,D,C,U		67.5	23.0	5.0	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
G	14	46.0	24.0	6.0	2.5	1.5	1.0	2.0	3.5	12.0
G,D		52.0	25.0	5.0	2.0	1.0	1.0	1.5	3.5	9.0
G,D,C,U		60.5	26.5	6.5	2.0	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
G	28	43.5	25.0	6.5	2.5	1.5	1.5	1.5	3.0	15.5
G,D		46.5	27.0	5.5	2.5	1.5	1.5	1.5	4.0	10.0
G,D,C,U		49.5	31.0	9.0	3.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2.5

#### 7.4.4 „CUCCCC“ Primer

##### 7.4.4.1 Einbau von G

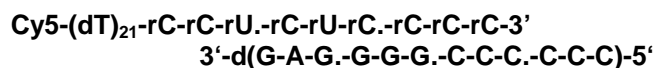


Tabelle 92: Primer 16, Templat 60, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MeImpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	65.5	10.5	2.5	2.0	3.0	11.5	5.5
G	2	53.5	8.0	2.5	2.0	3.5	15.0	15.5
G	3	44.0	8.0	2.0	2.0	4.0	17.0	23.0
G	7	27.0	8.5	3.0	2.5	4.5	14.0	40.5
G	14	19.5	7.0	2.0	2.0	5.0	10.5	54.0
G	28	13.5	7.0	2.5	2.0	3.0	9.5	62.0

## 7.4.4.2 Einbau von G und A/D

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rU.-rC-rU-rC.-rC-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-A-G.-G-G-G.-C-C-T.-T-C-C.-C-T-C)-5'**

Tabelle 93: : Primer 16, Templat 44, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9+10
G	1	62.5	32.0	10.0	0.5						
G,A		68.5	21.0	8.5	1.5	0.5					
G,D		69.5	14.0	5.5	3.0	3.0	3.0	1.5	0.5		
G	2	54.0	27.0	17.0	1.5	0.5					
G,A		65.0	20.0	11.0	3.0	1.0	0.5				
G,D		64.0	15.0	6.0	3.5	4.5	4.5	2.0	1.0		
G	3	47.5	27.5	17.5	7.0	0.5					
G,A		58.5	21.5	13.5	4.5	1.5	0.5				
G,D		58.5	15.0	6.5	4.5	4.5	5.5	3.5	1.5	0.5	
G	7	43.5	24.5	25.0	5.0	1.0	0.5	0.5			
G,A		52.0	23.0	14.5	6.5	2.5	1.0	0.5			
G,D		49.0	17.5	7.0	5.0	5.0	6.5	6.0	3.5	1.0	0.5
G	14	39.5	24.5	26.5	7.5	1.5	0.5	0.5			
G,A		46.0	25.5	15.0	8.0	3.0	1.5	1.0	0.5		
G,D		44.5	20.0	7.0	5.0	4.5	6.0	6.5	4.0	1.5	0.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rU.-rC-rU-rC.-rC-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-A-G.-G-G-G.-C-C-T.-T-C-C)-5'**

Tabelle 94: Primer 16, Templat 51, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	50.5	33.5	15.5	0.5			
G,A		54.5	25.5	17.0	3.0	3.0		
G,D		55.0	15.5	8.0	5.0	5.5	9.0	2.5
G	2	36.0	33.0	27.0	3.0			
G,A		43.5	23.5	24.5	6.5	1.5	0.5	
G,D		41.0	14.5	8.0	5.5	7.5	15.0	8.5
G	3	28.0	31.0	38.0	3.5			
G,A		38.0	22.0	27.0	9.5	9.5	2.5	1.0
G,D		37.5	12.0	6.5	5.5	8.0	17.0	13.5
G	7	19.0	22.0	51.0	8.0	0.5		
G,A		27.5	18.5	29.0	16.0	6.0	2.0	1.0
G,D		28.5	12.0	6.5	5.5	7.5	15.0	25.5
G	14	15.0	16.5	52.5	13.5	2.0		
G,A		23.0	16.5	26.0	20.0	8.0	4.0	3.0
G,D		24.0	12.0	6.5	5.0	6.5	12.5	33.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rU.-rC-rU-rC.-rC-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-A-G-A-G-G-G-G-C-C-T.-T-C-C-C-T-C)-5'**

Tabelle 95: Primer 16, Templat 49, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9+10
G	1	62.5	26.0	10.5	1.0	0.5					
G,A		54.0	26.0	16.0	3.0	1.0	0.5				
G,D		66.0	13.5	6.0	3.0	3.5	3.0	2.0	1.0	1.0	0.5
G	2	48.0	29.0	20.0	2.0	0.5	0.5				
G,A		48.0	22.5	20.0	5.5	2.5	1.0	0.5			
G,D		53.5	14.5	7.0	4.5	5.5	4.0	4.0	2.5	2.5	2.0
G	3	41.0	33.0	25.5	3.5	1.5	1.0	0.5			
G,A		42.0	21.5	21.5	8.0	3.5	1.5	1.5	0.5		
G,D		49.5	14.0	6.5	4.5	7.5	6.0	4.5	2.5	3.0	3.0
G	7	30.5	24.5	35.5	6.5	1.5	1.0	0.5			
G,A		34.5	19.5	22.0	11.5	5.5	3.0	2.5	1.5	0.5	
G,D		35.0	14.0	7.0	6.5	8.5	8.0	6.0	4.0	5.0	4.0
G	14	25.5	21.0	39.5	10.0	2.0	1.5	1.0			
G,A		30.0	18.5	20.5	14.0	6.5	3.5	3.5	2.5	1.0	0.5
G,D		30.5	14.5	6.5	5.5	7.0	8.0	12.5	5.5	5.5	5.0
G	28	16.0	15.0	41.0	16.5	4.5	3.0	2.0	1.0	0.5	
G,A											
G,D		30.0	14.0	6.0	6.5	8.0	7.5	7.5	6.0	2.5	12.0

#### 7.4.4.3 Einbau von drei Imidazoliden

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rU.-rC-rU-rC.-rC-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-A-G-G-G-G-G-C-A.-C-G-C)-5'**

Tabelle 96: Primer 16, Templat 43, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,U	1	79.0	19.5	1.5				
G,C,U	2	75.0	22.5	2.5				
G,C,U	3	69.5	29.0	4.5	0.5			
G,C,U	7	59.5	27.5	7.0	1.0			
G,C,U	14	54.5	36.0	11.0	2.0	0.5		



## 7.4.5 „CCGCC“ Primer

### 7.4.5.1 Einbau von G

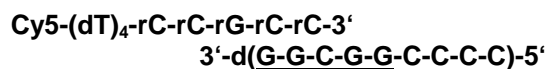


Tabelle 97: Primer 13, Templat 12, Konzentration Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	38.0	6.5	4.0	28.5	23.0
G	2	25.5	6.5	3.5	24.5	10.5
G	3	19.0	6.0	3.0	21.0	50.5
G	7	13.0	5.0	2.0	13.5	66.5
G	14	10.5	3.5	1.5	8.5	74.5

Tabelle 98: Primer 13, Templat 12, Konzentration Imidazolide: je 25 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G,D	1	66.5	11.0	7.0	12.0	3.5
G,D	2	54.5	11.5	7.5	17.0	9.5
G,D	3	48.0	11.0	7.5	19.0	15.0
G,D	7	37.5	12.0	6.0	18.0	26.5
G,D	14	33.0	13.0	6.0	15.0	33.5
G,D	28	32.5	14.5	5.0	12.5	36.1

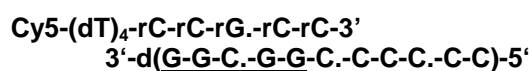


Tabelle 99: Primer 13, Templat 17, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	20.0	5.5	2.0	2.5	4.5	33.0	32.5
G,C		43.5	8.5	4.0	5.5	9.5	20.0	9.5
G,C,A,U		60.5	9.0	4.0	5.0	6.5	10.5	5.0
G	2	16.0	5.5	1.5	2.0	3.0	22.0	50.0
G,C		40.0	10.5	5.5	5.5	7.5	14.5	17.5
G,C,A,U		50.5	9.5	3.5	5.0	7.0	13.5	11.5
G	3	13.0	5.0	1.5	1.5	2.5	17.0	60.0
G,C		28.5	8.0	3.5	4.5	7.0	20.5	28.0
G,C,A,U		49.0	9.0	3.5	4.5	6.5	13.0	15.0
G	7	11.0	5.0	1.5	1.0	1.5	9.5	71.0
G,C		22.0	7.5	2.0	2.0	3.5	14.5	49.0
G,C,A,U		40.5	9.0	3.0	4.0	5.5	11.0	27.5
G	14	10.5	5.5	2.0	2.0	2.5	7.0	71.5
G,C		20.0	7.0	1.5	1.0	2.0	10.0	58.0
G,C,A,U		37.0	9.0	2.5	3.5	4.5	9.5	33.5

## 7.4.5.2 Einbau von G und A/D

Cy5-(dT)<sub>4</sub>-rC-rC-rG-rC-rC-3'3'-d(G-G-C-G-G-C-C-T-T-C-C)-5'

Tabelle 100: Primer 13, Templat 13, Konz. Imidazolide: je 25 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,D	1	71.0	13.5	5.0	3.0	3.5	3.5	0.5
G,D	2	61.0	14.0	5.0	4.0	5.5	7.5	3.0
G,D	3	55.5	14.0	5.5	4.0	6.0	10.0	5.5
G,D	7	45.5	14.0	5.0	4.0	6.5	12.0	12.5
G,D	14	40.5	14.5	5.0	4.0	6.0	11.0	19.5

Tabelle 101: Primer 13, Templat 13, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	55.5	34.0	10.5	0.5			
G,A		75.5	18.0	5.0	1.0			
G,D		65.5	16.0	6.0	3.5	3.5	4.0	1.0
G	2	43.5	36.5	18.5	2.0			
G,A		68.0	21.0	8.0	2.5			
G,D		57.5	17.0	5.5	4.0	5.5	8.0	3.0
G	3	39.0	27.0	25.0	3.0	0.5		
G,A		62.5	21.0	10.0	4.0	1.5	0.5	
G,D		52.0	15.5	5.0	4.0	6.0	10.5	6.5
G	7	30.5	28.5	34.0	6.0	1.0		
G,A		53.5	25.5	10.5	6.5	2.5	1.0	0.5
G,D		43.5	13.5	4.5	4.0	6.5	12.5	15.0
G	14	27.5	19.0	36.5	10.0	5.0	1.5	1.0
G,A		48.0	23.0	9.0	9.5	6.0	2.5	2.0
G,D		37.5	13.5	6.5	4.5	6.0	11.0	21.5

Cy5-(dT)<sub>4</sub>-rC-rC-rG-rC-rC-3'3'-d(G-G-C-G-G-C-C-C-C-T-C)-5'

Tabelle 102: Primer 13, Templat 14, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	26.5	6.0	3.5	22.0	38.0	4.0	0.5
G,A		58.5	10.5	8.0	13.0	6.0	3.0	0.5
G,D		45.5	10.0	8.0	10.0	8.0	13.0	5.5
G	2	17.0	5.5	2.5	12.5	49.0	9.0	3.0
G,A		46.0	10.5	7.0	15.0	10.0	5.5	1.5
G,D		35.5	9.0	6.0	8.0	8.0	17.5	16.0
G	3	13.5	5.0	2.5	11.0	53.0	11.5	4.5
G,A		40.0	10.5	7.0	14.5	13.5	11.0	5.0
G,D		29.0	8.5	5.0	6.5	7.5	18.0	25.0
G	7	8.5	4.0	1.0	6.0	53.5	16.5	10.5
G,A		28.5	12.0	4.5	11.5	15.5	14.0	14.0
G,D		26.5	8.0	4.0	4.5	6.5	14.0	41.5
G	14	8.5	4.0	1.5	4.5	46.0	18.5	17.5
G,A		23.5	12.0	4.5	9.5	14.5	14.0	22.0
G,D		19.0	9.5	3.0	4.0	5.5	10.5	49.0

## 7.4.6 „CCCCC“ Primer

### 7.4.6.1 Einbau von G

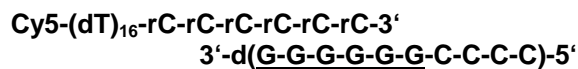


Tabelle 103: Primer 12 , Templat 11, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	58.5	5.5	3.0	18.0	15.5
G,D		64.0	8.0	7.5	15.0	5.0
G	2	56.5	6.5	2.0	13.0	22.5
G,D		58.0	7.5	5.5	17.5	12.0
G	3	52.5	8.0	1.5	9.0	28.5
G,D		56.0	7.5	4.0	14.0	18.0
G	7	50.5	10.5	1.5	6.0	31.5
G,D		50.5	10.0	3.5	12.0	24.0
G	14	47.0	13.0	2.0	4.0	33.0
G,D		48.5	12.5	3.5	9.0	27.0

### 7.4.6.2 Einbau von G und C

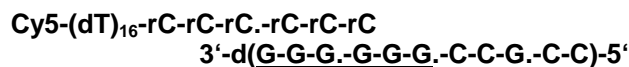


Tabelle 104: Primer12, Templat 15, Konz. Imidazolide: je 25 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G,C	1	59.5	13.0	5.0	16.5	4.5	1.5
G,C	2	52.5	13.0	4.0	21.0	7.0	2.5
G,C	3	49.0	14.0	3.0	17.0	10.5	7.0
G,C	7	40.0	16.5	4.0	20.5	10.5	10.0
G,C	14	34.0	19.0	4.5	18.0	9.5	10.5

Tabelle 105: Primer12, Templat 15, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	70.0	23.0	7.0	0.5		
G,C		53.5	14.0	6.0	21.5	4.5	1.0
G	2	65.5	23.5	10.0	0.5		
G,C		41.0	13.5	4.5	28.0	10.0	3.5
G	3	61.5	26.5	11.0	1.0		
G,C		37.5	14.0	4.0	27.0	12.0	6.0
G	7	59.0	26.5	11.5	2.0	1.0	1.0
G,C		34.5	15.5	2.5	22.5	13.0	12.0
G	14	55.5	29.0	11.5	2.0	1.0	1.0
G,C		29.0	18.0	4.0	17.5	12.5	19.5

## 7.4.6.3 Einbau von G und A/D

**Cy5-(dT)<sub>16</sub>-rC-rC-rC-rC-rC-rC**  
**3'-d(G-G-G-G-G-G-C-C-T-T-C-C)-5'**

Tabelle 106: Primer 12, Templat 9, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	44.5	30.0	24.0	1.0			
G,A		64.0	18.0	15.0	2.5	0.5		
G,D		53.5	11.5	9.5	5.0	6.5	10.0	4.5
G	2	40.5	26.5	29.5	2.5	0.5		
G,A		52.5	18.0	21.5	6.0	1.5	0.5	
G,D		45.0	9.5	5.5	4.5	6.5	15.0	14.0
G	3	39.5	25.0	30.0	4.0	0.5	1.0	
G,A		49.0	17.0	22.5	8.0	2.5	0.5	0.5
G,D		42.0	10.0	4.5	4.0	5.5	15.0	24.0
G	7	37.0	25.5	27.5	5.5	1.0	2.0	1.0
G,A		42.0	16.5	21.0	12.5	5.0	2.0	1.0
G,D		35.5	11.0	3.5	2.5	3.0	10.5	34.0
G	14	34.5	27.0	25.0	6.5	3.5	2.5	1.5
G,A		38.0	18.0	19.0	14.0	6.0	3.0	2.5
G,D		35.5	12.5	3.5	2.5	2.5	6.5	37.0

**Cy5-(dT)<sub>16</sub>-rC-rC-rC-rC-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-G-G-G-G-C-T-C-C-T-C-C)-5'**

Tabelle 107: Primer 12, Templat 10, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	86.5	13.0	1.0	0.5	0.5			
G,A		79.5	10.0	5.0	4.0	1.5	0.5		
G,D		68.5	7.5	5.5	6.5	4.0	6.0	2.0	
G	2	83.5	14.0	1.5	0.5	1.0			
G,A		70.0	12.0	6.0	6.0	3.5	2.0	0.5	
G,D		54.5	8.0	5.5	6.5	6.0	11.5	7.5	0.5
G	3	78.0	16.0	1.5	0.5	1.0	0.5	0.5	
G,A		66.0	13.0	6.0	6.5	4.5	3.0	1.0	
G,D		49.0	8.5	5.0	5.0	6.0	12.5	12.0	1.5
G	7	75.0	20.5	2.5	0.5	1.0	0.5	0.5	
G,A		53.0	18.5	6.0	6.0	7.0	5.5	3.5	1.0
G,D		42.5	10.0	3.5	3.0	5.0	10.5	20.0	5.5
G	14	69.5	25.1	4.0	0.5	0.5	0.5	0.5	
G,A		51.0	20.5	3.0	4.5	7.0	5.0	4.5	2.0
G,D		36.0	12.0	5.5	2.0	4.5	7.5	23.5	12.5

#### 7.4.6.4 Einbau von drei Imidazoliden

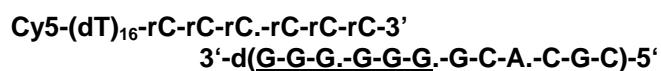


Tabelle 108: Primer 12, Templat 58, Konz. Imidazole: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,C,U	1	82.5	17.0	0.5				
G,C,U	2	80.0	16.0	5.5				
G,C,U	3	75.5	22.5	2.0				
G,C,U	7	65.5	28.0	5.5	1.0			
G,C,U	14	57.5	33.0	8.5	1.5			
G,C,U	28	45.0	40.0	13.0	3.5	1.0		

#### 7.4.6.5 Zufallseinbau

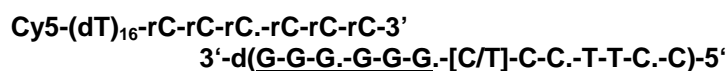


Tabelle 109: Primer 12, Templat 68, Konz. Imidazole je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	79.0	20.5	10.0	4.5				
G,D		52.5	18.0	10.5	9.0	3.5	3.5	3.5	0.5
G,D,C,U		56.5	21.0	13.0	6.5	2.0	1.0	0.5	
G	2	72.0	8.0	10.0	9.0	0.5			
G,D		36.0	18.5	9.5	10.0	5.5	7.0	10.0	3.5
G,D,C,U		47.5	20.0	14.0	10.5	4.0	2.5	1.5	0.5
G	3	67.5	9.5	9.0	12.5	2.5	0.5		
G,D		29.0	16.5	7.5	9.0	6.0	10.0	15.0	10.5
G,D,C,U		42.5	19.0	13.5	12.0	5.5	4.0	3.0	1.0
G	7	63.0	12.5	6.0	13.5	3.0	1.5		
G,D		24.0	15.5	4.5	6.5	5.0	8.5	17.5	18.5
G,D,C,U		32.5	18.5	11.5	13.0	8.0	6.5	6.0	4.0
G	14	60.5	16.0	4.5	12.5	3.5	2.0		
G,D		21.5	15.0	4.0	5.4	4.5	6.0	15.0	27.0
G,D,C,U		27.5	17.5	10.0	13.0	9.0	7.5	7.5	8.5

**Cy5-(dT)<sub>16</sub>-rC-rC-rC-rC-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-G-G-G-G-[C/T]-[C/T]-C-C-T-T-C-C)-5'**

Tabelle 110: Primer 12, Templat 69, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G	1	88.5	6.5	1.5	2.5	1.0				
G,D		66.5	12.0	6.0	6.0	3.0	2.0	1.5	1.5	
G,D,C,U		67.5	17.5	6.5	5.5	2.5	0.5	0.5		
G	2	84.0	9.0	1.5	2.5	3.0				
G,D		52.0	16.5	9.0	6.5	7.0	4.0	4.5	5.0	1.5
G,D,C,U		60.5	17.0	7.0	7.5	5.0	2.0	1.0	0.5	
G	3	79.5	11.0	2.0	2.5	4.5	0.5			
G,D		42.0	12.5	7.0	6.0	7.5	5.0	7.5	9.0	4.0
G,D,C,U		56.0	17.0	7.0	7.5	6.5	3.0	2.0	1.0	0.5
G	7	72.0	16.5	2.0	2.0	5.5	1.0			
G,D		35.5	12.5	6.5	4.5	6.0	4.5	7.5	12.0	11.0
G,D,C,U		45.0	19.5	7.5	7.5	8.5	4.5	3.5	2.5	1.5
G	14	71.5	19.5	2.0	1.0	5.5	0.5			
G,D		30.5	13.5	6.0	4.0	5.5	4.5	7.0	12.0	18.5
G,D,C,U		37.0	20.5	7.5	7.5	9.0	6.0	4.5	4.0	4.5

**Cy5-(dT)<sub>16</sub>-rC-rC-rC-rC-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-G-G-G-G-[A/C/G/T]-C-C-T-T-C-C)-5'**

Tabelle 111: Primer 12, Primer 73, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	81.5	8.0	7.5	3.0				
G,D		68.0	13.5	6.5	5.0	2.5	2.5	2.0	0.5
G,D,C,U		76.0	14.5	5.0	2.5	0.5			
G	2	77.5	10.0	8.0	5.0				
G,D		59.0	14.5	5.5	5.0	3.5	5.0	6.0	2.5
G,D,C,U		65.5	19.0	7.0	4.5	2.0	1.0	0.5	
G	3	72.0	12.5	7.5	6.5	1.5			
G,D		52.0	15.5	5.0	4.5	3.5	6.0	8.5	4.5
G,D,C,U		59.0	21.0	8.0	5.5	2.5	2.0	1.5	0.5
G	7	68.5	16.5	5.5	6.5	2.0	2.0		
G,D		47.0	18.5	4.5	4.0	3.0	4.5	8.5	10.0
G,D,C,U		50.5	24.0	8.0	6.0	3.5	3.0	2.5	3.5
G	14	66.5	19.5	4.5	5.5	2.0	2.0		
G,D		43.5	19.5	4.0	3.0	2.5	4.0	9.0	14.5
G,D,C,U		43.5	25.5	9.0	7.0	4.0	3.5	3.5	4.0

**Cy5-(dT)<sub>16</sub>-rC-rC-rC-rC-rC-3'**

**3'-d(G-G-G-G-G-G-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-C.C-T-T.-C-C)-5'**

Tabelle 112: Primer 12, Templat 74, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G	1	93.5	5.5	0.5	0.5	0.5				
G,D		87.5	9.5	2.0	0.5	0.5	0.5			
G,D,C,U		88.0	10.5	1.0	0.5					
G	2	91.0	7.5	0.5	0.5	0.5				
G,D		82.5	12.0	2.0	2.0	1.0	0.5	1.0	0.5	
G,D,C,U		83.0	14.5	2.0	0.5	0.5				
G	3	88.0	10.5	1.0	0.5	0.5				
G,D		75.0	18.5	3.5	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5
G,D,C,U		75.0	18.5	3.5	1.5	0.5				
G	7	81.0	16.5	1.5	0.5	1.0				
G,D		69.0	24.0	4.0	1.5	1.0	0.5	1.0	2.0	1.5
G,D,C,U		67.0	22.5	5.0	3.5	1.5	0.5	0.5		
G	14	76.0	21.0	3.0	0.5	0.5				
G,D		65.5	23.5	3.5	1.0	1.0	0.5	1.0	2.0	2.0
G,D,C,U		61.0	27.5	6.5	2.5	1.5	0.5	0.6	0.5	0.5

## 7.4.7 „CCCCCG“ Primer

### 7.4.7.1 Einbau von C

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rC-rC-rG-3'**

**3'-d(G-G-G-G-G-G-C-C-C-C.-C)-5'**

Tabelle 113: Primer 17, Templat 24, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	27.0	14.0	19.0	24.5	15.5
G,D		36.5	19.0	17.0	17.5	9.5
G	2	21.5	10.5	18.0	25.0	25.0
G,D		29.5	17.0	17.5	20.0	16.5
G	3	19.0	8.5	16.5	25.5	30.5
G,D		26.5	15.5	17.0	20.5	20.5
G	7	14.0	9.0	16.5	24.5	36.0
G,D		23.0	13.5	15.5	20.0	28.5
G	14	12.0	10.5	16.5	24.0	37.0
G,D		19.5	12.0	14.5	19.0	35.5

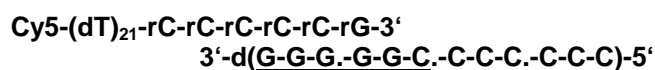


Tabelle 114: Primer 17, Templat 80, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	42.0	17.0	15.5	12.0	9.5	4.0	
G,D		55.5	19.5	12.0	7.0	5.0	1.5	
G	2	29.0	16.0	17.5	14.5	17.0	6.0	
G,D		41.0	18.5	15.0	11.0	11.5	3.5	
G	3	25.5	14.5	17.5	15.5	13.5	14.0	
G,D		39.0	16.5	14.5	11.5	9.0	9.0	
G	7	19.0	12.5	17.0	17.0	15.5	16.0	2.0
G,D		36.5	15.0	14.5	12.0	10.5	11.0	
G	14	17.5	14.0	17.0	17.0	15.0	15.0	4.5
G,D		30.0	15.0	14.0	13.0	11.0	13.0	3.5

#### 7.4.7.2 Einbau von G und D

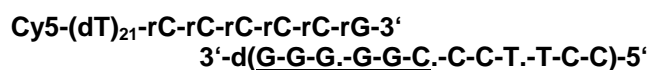


Tabelle 115: Primer 17, Templat 21, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	16.5	40.5	35.5	5.5	2.0		
G,D		12.0	20.0	24.0	11.5	13.0	16.0	3.0
G	2	12.5	29.0	47.0	9.0	2.5		
G,D		10.0	12.5	15.5	10.0	14.5	26.5	11.0
G	3	10.0	23.0	51.0	13.0	3.5		
G,D		6.5	8.5	10.0	8.0	13.5	32.0	22.0
G	7	6.0	15.0	52.5	20.0	7.0		
G,D		4.0	3.5	6.0	4.5	9.5	28.5	43.5
G	14	5.5	13.0	48.0	24.5	9.0		
G,D		4.5	4.0	5.5	4.0	6.5	21.5	54.5

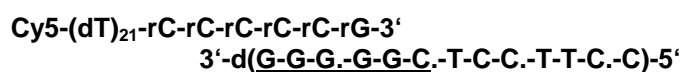


Tabelle 116: Primer 17, Templat 23, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	61.0	17.0	12.5	7.0	2.5			
G,D		11.5	8.5	18.0	22.0	11.5	13.0	13.0	2.0
G	2	51.0	19.0	15.5	10.5	4.0			
G,D		7.5	4.0	8.5	12.5	10.5	17.5	29.0	10.5
G	3	49.5	16.0	16.0	13.0	6.0			
G,D		4.5	2.0	4.0	7.5	7.5	16.5	37.0	21.5
G	7	42.5	14.5	17.5	15.5	9.5			
G,D		4.0	2.0	2.5	4.5	4.5	11.0	31.0	40.5
G	14	34.0	19.0	20.0	16.5	10.5			
G,D		3.5	2.0	2.0	5.0	5.5	8.0	24.0	50.0



## 7.4.7.3 Zufallseinbau

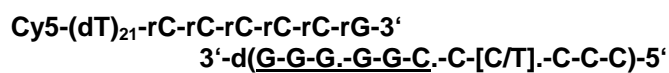


Tabelle 117: Primer 17, Templat 26, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	34.0	22.0	15.5	14.0	12.5	2.0
G,D		31.5	12.0	12.0	14.0	23.5	7.0
G	2	27.0	18.0	17.0	20.0	20.0	3.0
G,D		23.5	8.5	8.5	12.0	29.5	18.0
G	3	24.0	16.5	17.0	16.5	16.5	10.0
G,D		19.5	7.0	7.0	11.0	28.0	27.5
G	7	21.5	14.0	16.5	17.0	17.5	13.5
G,D		17.5	7.5	6.0	8.0	22.0	39.0
G	14	17.5	14.5	16.5	17.0	21.0	13.5
G,D		17.0	7.0	4.5	6.5	18.5	46.0

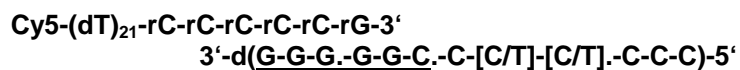


Tabelle 118: Primer 17, Templat 85, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	35.0	39.0	15.5	5.5	3.5	2.0	
G,D		34.5	29.5	11.0	6.5	7.0	10.0	2.0
G	2	25.5	32.5	21.5	10.0	5.0	5.5	0.5
G,D		25.5	24.5	12.0	7.0	8.5	17.5	5.5
G	3	22.0	28.0	23.5	12.5	7.0	7.0	0.5
G,D		20.5	20.5	12.0	7.5	9.0	21.0	10.0
G	7	18.0	21.5	20.0	16.0	11.0	8.0	0.5
G,D		16.0	14.5	11.5	7.0	8.0	23.0	20.0
G	14	13.5	17.0	25.0	18.0	13.5	10.5	2.5
G,D		14.0	11.0	9.5	5.5	7.0	24.5	29.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rC-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-G-G-G-G-C-[A/C/G/T]-C-C-C)-5'**

Tabelle 119: Primer 17, Templat 86, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5+6
G	1	50.0	29.0	10.0	6.5	4.5	
G,D		54.5	20.0	8.5	6.0	9.0	2.5
G,C		47.0	22.5	18.0	6.5	5.5	1.0
G,D,C,U		60.5	23.0	11.0	3.0	2.0	0.5
G	2	43.0	27.0	13.5	9.0	6.0	1.5
G,D		48.0	19.0	8.0	5.5	13.0	6.5
G,C		37.0	20.5	19.5	9.0	10.0	4.0
G,D,C,U		49.5	24.0	15.0	5.5	4.5	1.5
G	3	34.5	25.0	16.5	12.0	9.0	4.0
G,D		40.0	19.0	10.0	6.5	13.5	11.0
G,C		32.0	19.5	19.0	10.0	12.0	7.5
G,D,C,U		42.0	24.0	17.5	7.0	6.5	3.0
G	7	30.0	20.0	19.0	14.0	12.5	5.0
G,D		34.5	17.0	11.0	7.0	12.0	18.5
G,C		28.0	18.0	17.0	10.0	12.5	14.5
G,D,C,U		33.0	23.0	18.5	8.5	8.5	8.0
G	14	26.5	20.0	20.0	15.0	11.5	6.5
G,D		32.5	16.5	11.0	6.5	10.5	23.5
G,C		23.5	18.0	16.0	10.5	11.5	21.0
G,D,C,U		28.5	22.0	19.0	10.0	9.5	11.5

**Cy5-(dT)<sub>21</sub>-rC-rC-rC-rC-rG-3'**  
**3'-d(G-G-G-G-G-C-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-C-C-C)-5'**

Tabelle 120: Primer 17, Templat 87, Konz. Imidazolide je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	41.0	15.0	15.5	16.5	12.5		
G,D		49.0	12.0	12.0	14.5	11.5	1.5	
G,C		62.0	9.0	9.0	12.0	7.5		
G,D,C,U		75.5	12.5	5.5	4.5	1.5		
G	2	38.5	12.5	15.0	16.5	18.0		
G,D		40.0	12.5	12.5	14.0	15.5	4.0	0.5
G,C		53.5	12.5	9.5	12.5	12.0		
G,D,C,U		68.5	14.5	6.0	6.0	4.5	0.5	
G	3	37.5	12.5	14.5	16.0	19.5		
G,D		38.0	11.0	12.0	14.5	17.5	6.5	1.0
G,C		50.0	13.5	10.0	12.5	14.0		
G,D,C,U		61.5	16.5	7.0	7.0	6.5	1.5	
G	7	32.5	13.5	15.5	16.0	22.5		
G,D		37.5	11.5	11.5	13.0	17.0	7.5	2.5
G,C		44.0	15.0	10.0	12.5	18.0		
G,D,C,U		57.0	19.0	7.0	7.0	8.5	2.0	
G	14	23.0	17.0	18.0	18.0	20.0	4.5	
G,D		39.0	14.5	12.0	13.0	16.0	8.0	7.0
G,C		34.5	21.0	13.0	13.0	17.0	1.5	
G,D,C,U		42.5	21.5	13.0	9.0	9.0	2.5	2.0

## 7.4.8 „CCUUC“ Primer mit verkürztem Spacer

### 7.4.8.1 Einbau von G

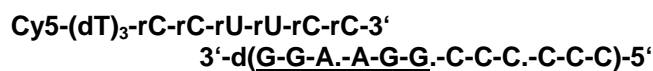


Tabelle 121: Primer 21, Templat 18, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	13.0	3.0	1.5	2.5	4.5	40.0	35.0
G	2	10.0	3.5	1.5	2.0	3.0	24.0	56.5
G	3	9.0	3.5	1.5	2.0	2.5	16.5	65.0
G	7	7.0	3.0	1.5	1.5	2.0	7.5	75.5
G	14	7.0	3.5	1.5	1.5	2.5	6.5	77.5

### 7.4.8.2 Zufallseinbau

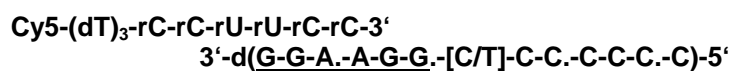


Tabelle 122: Primer 21, Templat 66, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	33.5	8.0	6.0	5.5	6.0	7.5	20.5	14.0
G,D		54.5	12.5	5.5	4.5	4.5	6.0	9.5	3.5
G	2	21.5	7.0	5.5	5.0	4.5	6.5	23.5	27.0
G,D		40.0	18.5	6.0	5.0	5.5	7.5	14.0	8.5
G	3	18.0	6.5	5.0	4.0	3.5	8.0	21.5	34.0
G,D		34.0	13.0	6.0	5.0	5.5	6.5	15.5	14.0
G	7	14.0	6.0	4.5	3.5	2.5	3.5	13.5	52.5
G,D		25.0	13.5	5.5	4.0	4.0	6.0	14.5	27.5
G	14	12.0	5.5	4.0	3.0	2.0	3.5	10.0	60.0
G,D		22.5	14.0	5.5	3.5	3.0	4.5	11.0	36.0

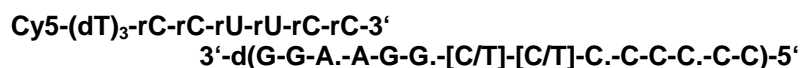


Tabelle 123: Primer 21, Templat 67, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G	1	51.5	10.5	4.5	4.5	3.5	3.0	4.0	12.0	6.5
G,D		57.0	10.0	7.0	4.5	4.0	4.0	5.0	7.0	2.0
G	2	37.5	13.0	5.0	5.0	3.5	3.0	4.0	14.0	15.0
G,D		41.5	10.0	9.5	6.0	4.5	4.5	6.5	11.0	6.5
G	3	33.5	14.5	5.5	5.0	3.0	2.5	4.0	12.0	20.5
G,D		33.0	10.5	10.0	6.0	4.5	4.0	6.5	13.5	12.0
G	7	25.5	15.0	6.0	5.0	3.0	2.5	3.0	8.5	31.5
G,D		21.5	9.5	11.0	6.5	4.5	4.0	6.0	16.5	22.5
G	14	22.5	15.0	6.5	5.0	3.0	2.5	3.0	7.0	35.5
G,D		18.0	9.5	9.5	6.0	4.5	3.5	5.0	11.0	32.5

**Cy5-(dT)<sub>3</sub>-rC-rC-rU-rU-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-A-A-G-G-[A/C/G/T]-C-C-C-C-C)-5'**

Tabelle 124: Primer 21, Templat 71, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7+8
G	1	50.5	7.0	3.5	3.0	3.0	4.5	19.5	9.5
G,D		74.0	9.0	3.0	2.0	2.5	3.5	5.5	1.0
G,D,C,U		91.0	7.0	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	
G	2	41.5	7.0	3.0	2.5	2.5	4.0	18.0	21.5
G,D		61.5	10.0	3.5	2.5	3.0	4.5	10.5	5.0
G,D,C,U		89.0	7.0	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
G	3	38.0	8.0	3.0	2.0	2.5	3.5	15.0	28.0
G,D		54.0	11.5	3.5	2.5	3.0	4.5	12.0	9.0
G,D,C,U		84.5	8.0	2.0	1.5	1.5	1.5	1.5	0.5
G	7	28.5	11.0	2.5	1.5	2.0	3.5	10.5	41.0
G,D		45.0	14.0	3.0	2.0	2.0	3.5	11.5	19.0
G,D,C,U		77.0	10.0	3.0	1.5	2.0	2.0	2.5	2.0
G	14	23.0	14.0	2.0	1.5	1.5	3.5	8.5	46.0
G,D		28.0	16.0	4.0	2.5	2.0	3.5	8.5	25.5
G,D,C,U		71.5	12.5	4.0	2.0	2.0	2.5	2.5	3.5

**Cy5-(dT)<sub>3</sub>-rC-rC-rU-rU-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-A-A-G-G-[A/C/G/T]-[A/C/G/T]-C-C-C-C-C)-5'**

Tabelle 125: Primer 21, Templat 72, Konz. Imidazolide: je 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8+9
G	1	70.0	12.5	2.0	1.5	1.5	1.0	2.0	5.5	3.5
G,D		92.5	7.0	0.5						
G,D,C,U		97.0	3.0							
G	2	66.0	15.0	2.0	1.5	1.0	1.0	2.0	5.5	7.0
G,D		88.0	10.0	2.0	0.5					
G,D,C,U		93.5	6.0	0.5						
G	3	60.5	17.5	2.5	1.5	1.5	1.0	2.0	4.5	9.0
G,D		81.5	12.5	2.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5
G,D,C,U		91.5	7.5	1.0						
G	7	50.5	24.0	4.0	1.5	1.0	1.0	1.5	4.0	12.5
G,D		69.5	16.0	3.5	1.5	1.0	1.0	1.5	3.0	3.5
G,D,C,U		87.5	11.5	1.5						
G	14	44.5	28.5	5.0	1.5	0.5	1.5	1.5	3.5	14.0
G,D		57.0	22.5	5.0	2.0	1.0	1.0	1.5	3.5	6.5
G,D,C,U		82.5	16.0	1.5						

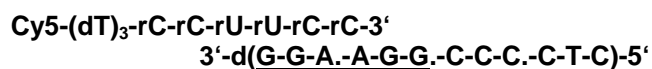


Tabelle 126: Primer 21, Templat 50, Konz. Imidazolid: 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G	1	18.0	3.5	6.0	37.5	33.0	2.0	
G,D		39.5	6.5	9.0	13.5	11.0	15.0	5.5
G	2	9.5	2.0	3.0	23.0	55.5	6.5	1.0
G,D		27.0	5.0	6.0	9.0	11.0	22.5	19.5
G	3	8.5	1.5	2.0	20.0	61.0	9.5	2.5
G,D		21.5	5.0	4.5	6.0	9.0	21.5	32.0
G	7	6.0	1.0	1.0	5.5	61.0	15.5	9.5
G,D		20.0	6.0	3.0	4.0	6.0	13.5	48.5
G	14	3.5	1.0	0.5	3.0	56.0	20.5	15.5
G,D		14.5	6.0	2.5	3.0	5.0	9.5	60.0

## 7.4.9 Zwei verschiedene Primer

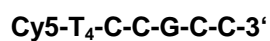
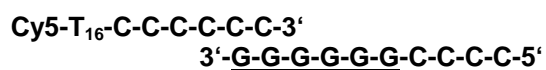


Tabelle 127: Primer 12, Primer 13 und Templat 11, Konz. Imidazolid 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	64.5	5.5	2.5	14.0	13.5
G	2	61.0	7.0	1.5	10.0	20.5
G	3	58.0	8.0	1.5	8.0	24.5
G	7	57.0	10.5	1.5	4.5	27.5
G	14	56.0	13.0	2.0	2.5	26.5

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	97.5	2.5			
G	2	96.5	3.5			
G	3	96.0	4.0			
G	7	93.0	6.5	0.5		
G	14	92.0	7.5	0.5		

**Cy5-T<sub>16</sub>-C-C-C-C-C-C-3'**

**Cy5-T<sub>4</sub>-C-C-G-C-C-3'**

**3'-G-G-C-G-G-C-C-C-5'**

Tabelle 128: Primer 12, Primer 13 und Templat 12, konz. Imidazolid 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	96.0	4.0			
G	2	95.0	5.0			
G	3	93.5	6.5			
G	7	87.5	12.0	1.0		
G	14	83.5	15.5	1.0		

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	32.0	7.0	5.0	30.5	25.0
G	2	24.5	4.5	2.0	27.0	41.5
G	3	19.5	5.0	2.5	21.0	52.0
G	7	14.5	4.0	2.0	13.0	66.0
G	14	14.5	3.5	0.5	7.5	74.0

**Cy5-T<sub>16</sub>-C-C-C-C-C-C-C-3'**

**3'-G-G-G-G-G-G-C-C-C-5'**

**Cy5-T<sub>4</sub>-C-C-G-C-C-3'**

**3'-G-G-C-G-G-C-C-C-5'**

Tabelle 129: Primer 12, Primer 13 und Templat 11, Templat 12, konz. Imidazolid 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	64.5	6.5	3.5	12.5	13.0
G	2	63.0	7.0	1.0	9.0	20.0
G	3	61.5	7.5	1.0	7.0	23.0
G	7	58.0	11.0	1.0	4.0	26.0
G	14	57.0	13.5	1.5	2.0	24.5

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4+5
G	1	31.5	7.5	5.0	30.5	25.0
G	2	22.0	4.5	2.0	27.5	44.5
G	3	15.5	5.0	2.5	21.5	55.0
G	7	12.0	3.0	0.5	12.5	71.5
G	14	11.5	3.0	0.5	7.5	79.0

**Cy5-(dT)<sub>16</sub>-rC-rC-rC-rC-rC-rC**  
**3'-d(G-G-G-G-G-G-C-C-T-T-C-C)-5'**

**Cy5-(dT)<sub>3</sub>-rC-rC-rU-rU-rC-rC-3'**

Tabelle 130: Primer 12, Primer 21, Templat 9, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,D	1	50.0	14.0	14.0	6.0	6.0	8.5	1.5
G,D	2	37.5	10.5	10.0	6.0	8.0	20.0	8.5
G,D	3	34.0	9.0	6.5	4.5	7.5	22.0	16.0
G,D	7	27.5	9.0	4.0	3.5	5.0	18.5	33.0
G,D	14	26.0	10.0	3.0	2.0	3.5	13.0	42.5

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,D	1	99.5	0.5					
G,D	2	93.5	6.5					
G,D	3	92.0	8.0					
G,D	7	86.5	13.5					
G,D	14	78.0	20.5	1.5				

**Cy5-(dT)<sub>3</sub>-rC-rC-rU-rU-rC-rC-3'**  
**3'-d(G-G-A-A-G-G-C-C-C-C-C-C)-5'**

**Cy5-(dT)<sub>16</sub>-rC-rC-rC-rC-rC-rC**

Tabelle 131: Primer 12, Primer 21, Templat 18, Konz. Imidazolide 50 mM

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,D	1	24.0	7.5	5.0	8.0	15.5	30.0	10.0
G,D	2	14.5	5.5	3.0	4.5	9.0	37.5	16.0
G,D	3	14.5	5.5	2.5	3.5	8.5	21.5	34.5
G,D	7	9.0	4.0	1.0	1.5	3.0	22.5	58.5
G,D	14	9.5	4.5	1.5	1.0	2.5	14.5	62.0

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,D	1	95.0	5.0					
G,D	2	93.0	7.0					
G,D	3	91.0	9.0					
G,D	7	83.0	16.0	1.0				
G,D	14	75.0	23.0	2.0				

#### 7.4.10 Aufreinigung eines vollverlängerten Produkts

Der Reaktionsansatz wurde verdreifacht. Es wurden die folgenden Volumina gemischt: 2.7 µl Primer, 6.3 µl Templat, 45 µl TRIS Puffer und 9 µl je Imidazolid, mit Wasser wurde auf ein Endvolumen von 90 µl eingestellt. Die Oligomerisation wurde 14 Tage bei 10°C durchgeführt. Anschließend erfolgte durch die Zugabe von 500 µl EtOH eine Fällung der Nucleinsäuren. Nach Zentrifugation und Abdekantieren wurde das Pellet in der SpeedVac getrocknet. Die Elektrophorese wurde mit 10 ml Gelmatrix, 100 µl APS und 10 µl TEMED durchgeführt. Als Laufpuffer wurden 400 ml eines 0.5 TBE Puffer verwendet. Bei einer Spannung von 200 V trennten sich die einzelsträngigen Nucleinsäure nach 60 min. nach ihrer Größe auf, die Banden wurden daraufhin sorgfältig ausgeschnitten. Die Gelstücke gab man in ein Eppendorf Gefäß, wo sie zerkleinert und in 1 ml Elutionspuffer (0.5 M NH<sub>4</sub>OAc, 1% SDS, 1mM EDTA) suspendiert wurden. Über Nacht wurde das Gefäß bei RT geschüttelt, um das blaue Produkt in Lösung zu bringen.

Mittels „Quantum Prep Freeze „N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Coloumns“ (*Biorad*) wurden die Gelstücke durch Zentrifugation bei 13,000 g für 3 Min. von der Lösung abgetrennt. Man wusch mit 500 µl sterilem Wasser sorgfältig nach. Eine nötige Entsalzung und Einkonzentrierung der Lösung wurde mit einer Membran-Ultra-Zentrifugation mit Microcon Membran-Filtern (*Millipore*) bei 15,000 g und 4°C durchgeführt. Anschließend wurde die restliche Flüssigkeit in der SpeedVac entfernt. Das Pellet nahm man in 50 µl NaOAc Puffer auf und versetzte die Lösung mit 500 µl EtOH, um die Oligonucleotide zu fällen. Man bewahrte die Lösung 1 h bei -18°C auf und zentrifugierte 30 min. bei 18000 rpm bei -10°C. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet an der SpeedVac getrocknet.



### 7.4.11 Rückreaktion

Die Rückreaktion wurde nach der Vorschrift aus Tabelle 5 angesetzt. Als Templat diente das getrocknete Pellet des verlängerten Primers der Hin-Reaktion, das in dem entsprechenden Volumen Wasser gelöst wurde. Die Probennahme erfolgte analog dem bekannten Verfahren.

**Cy5-(dT)<sub>3</sub>-rC-rC-rU-rU-rC-rC-3'**  
**3'-G-G-A.-A-G-G.-C-C-C.-C-C-C-d(T)<sub>16</sub>-Cy5**

Tabelle 132: Produktverteilung der Rück-Reaktion mit Primer 21 am verlängerten und aufgereinigten Primer 12 als Templat

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,D	1	57.5	12.0	11.0	5.5	5.5	7.5	1.5
G,D	2	35.5	11.0	9.0	6.5	9.5	20.5	8.5
G,D	3	36.5	9.0	5.5	4.5	7.5	23.0	13.5
G,D	7	27.5	8.5	3.0	2.5	5.0	20.0	33.0
G,D	14	25.0	10.0	3.0	2.0	3.5	14.0	42.0

**Cy5-(dT)<sub>16</sub>-rC-rC-rC.-rC-rC-rC**  
**3'-d(G-G-G.-G-G-G.-C-C-T.-T-C-C-d(T)<sub>3</sub>)-Cy5**

Tabelle 133: Produktverteilung der Rück-Reaktion mit Primer 12 am verlängerten und aufgereinigtem Primer 21 als Templat

2MelmpN	Tage	Primer	P1	P2	P3	P4	P5	P6+7
G,D	1	77.5	3.0	2.5	2.0	3.0	8.5	3.5
G,D	2	65.0	3.5	2.0	1.5	2.0	14.0	12.0
G,D	3	51.5	4.5	2.0	2.0	2.5	15.0	22.5
G,D	7	44.0	5.5	1.5	1.5	1.5	16.5	29.5
G,D	14	40.5	5.0	1.0	1.0	1.5	17.0	33.0

### 7.4.12 Hydrolyse, Dephosphorylierung und HPLC-Analytik

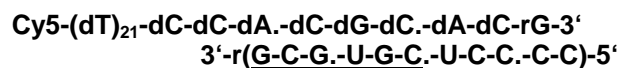
Die Oligomerisierung wurde in einem fünffachen Ansatz durchgeführt (5 µl einer 1 mM Lösung an Primer), die Aufreinigung erfolgte nach dem Verfahren, das in Kapitel 7.4.10 beschrieben wurde.

Die aufgereinigten trockenen Pellets nahm man in 10 µl sterilem Wasser auf und versetzte die Lösung zur alkalischen Hydrolyse mit 6 µl 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und inkubierte für 60 min. bei 90°C. Dann wurde mit 3 µl einer 1 M HOAc-Lösung neutralisiert und die Flüssigkeit an der SpeedVac entfernt.

Zur Dephosphorylierung löste man 10 µl des 10 x Puffers (50 mM Tris-HCl pH 9.3, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM Spermidin) in 90 ml Wasser und fügte 1 µl Alkalische Phosphatase gelöst in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl (*Promega*), 50% Glycerol zu. Man nahm das Pellet in 10 ml Wasser auf und versetzte mit 10 ml der verdünnten Alkalischen Phosphatase. Die Lösung wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend trocknete man erneut an der SpeedVac und nahm den Rückstand in 10 µl Wasser auf. Diese Lösung injizierte man vollständig zur Analyse in die HPLC. Die Bedingungen für die Trennung waren: linearer Gradient mit 0 min. 100 % A, 5 min. 100 % A, 30 min. 70 % A in B (A: NH<sub>4</sub>OAc 10 mM, pH 4.5, B: MeCN), Flussrate 0.8 ml/min., Säule Bischoff Prontosil 120-5 mm OD SAQ 5.0 µm.

Die Peaks wurden mit Borwin integriert und mit den Extinktionskoeffizienten von G = 11300 und D = 7370 normiert. Diese Werte setzte man in ein Verhältnis zueinander und erhielt so den Anteil des Einbaus von G und D. Für zwei Template wurde diese Analyse durchgeführt.

Zum ersten Fall:



Bei diesem Experiment ließ sich ein Wert von 5.6:1 zugunsten von G ermitteln. Über eine Rechnung ließ sich ermitteln, zu welchem Anteil der korrekte Einbau von D gegenüber von T erfolgte. Dazu stellte man die folgende Gleichung auf:

Korrechter Einbau: 1D + 4G      Falscher Einbau: 5G

x entspricht dem Anteil des korrekten Einbaus

$$xD = 4xG + (1-x) 5G$$

$$xD = 4xG + 5G - 5xG$$

$$xD = 5G - xG$$

$$xD / (5-x)G = 1D / 5.6G$$

$$x / 5 - x = 1 / 5.6$$

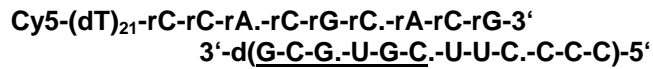
$$5.6x = 5 - x$$

$$6.6x = 5$$

$$x = 5 / 6.6 = 0.757$$

Das bedeutet, dass der korrekte Einbau von D gegenüber von T zu 76% erfolgte.

Zum zweiten Fall:



Für dieses Experiment ließ sich ein Wert von 2.6:1 zugunsten von G ermitteln.

Hier konnte man zwei Situationen unterscheiden, einmal der einfach falsche Einbau und einmal der doppelt falsche Einbau von G gegenüber von T.

Für den einfach falschen Einbau läßt sich diese Gleichung aufstellen:

Korrektter Einbau:  $2D + 4G$       Einfach falscher Einbau:  $1D + 5G$

$$4xG + 2xD = (1-x)D + (1-x) 5G$$

Für x ergab sich analog der obigen Berechnung ein Wert von 0.667. Das bedeutete, dass der korrekte Einbau von D gegenüber von T zu 67% erfolgte.

Für den doppelt falschen Einbau ließ sich diese Gleichung aufstellen:

Korrektter Einbau:  $2D + 4G$       Doppelt falscher Einbau:  $6G$

$$2xD + 4xG = 6(1-x) G$$

Hier ergibt sich für x der Wert 0.83. Es wird D gegenüber von T zu 83% korrekt eingebaut.

## 7.5 Hydrolyseexperimente nach Usher/McHale

Für diese Experimente wurden die folgenden Stammlösungen verwendet:

EDA	1 M bei pH 8
TRIS HCl	1 M bei pH 7.4
MgCl <sub>2</sub>	1 M
Cy5-Oligonucleotid	1mM
PolyU	100 mM an Phosphaten
DNA-Gegenstrang	1 mM

Die Experimente wurden nach den folgenden Tabellen angesetzt:

Tabelle 134: Hydrolyse bei 37°C in EDA

Experiment	Cy5-Oligo	PolyU	EDA	Wasser
MH 822	Primer 18, 1 µl	24 µl	75 µl	0 µl
MH 823	Primer 18, 1 µl	0 µl	75 µl	24 µl
MH 824	Primer 19, 1 µl	24 µl	75 µl	0 µl
MH 825	Primer 19, 1 µl	0 µl	75 µl	24 µl

Tabelle 135: Hydrolyse bei 10°C in EDA

Experiment	Cy5-Oligo	PolyU	EDA	Wasser
MH 826	Primer 18, 1 µl	24 µl	75 µl	0 µl
MH 827	Primer 18, 1 µl	0 µl	75 µl	24 µl
MH 828	Primer 19, 1 µl	24 µl	75 µl	0 µl
MH 829	Primer 19, 1 µl	0 µl	75 µl	24 µl

Zur Probennahme pipettierte man 1 ml dieser Lösungen in 50 ml Formamid. Sie erfolgte nach 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 24 h und 48 h.

Nach Integration und erhielt man die folgenden Werte für den Anteil von A12 im Vergleich zum gebildeten A6 in Abhängigkeit von der Zeit.

Tabelle 136: Anteil von A12 bei Hydrolyse in EDA bei 37°C

Zeit (h)	MH 822	MH 823	MH 824	MH 825
0	93.0	92.3	93.5	93.0
0.5	92.8	89.1	87.9	90.5
1	92.8	88.0	82.4	89.1
2	92.8	88.8	75.1	86.3
4	92.8	89.4	59.1	85.3
7	91.5	87.4	47.3	83.3
24	91.8	87.0	16.4	76.9
48	90.0	86.7	5.3	65.1

Tabelle 137: Anteil von A12 bei Hydrolyse in EDA bei 10°C

Zeit (h)	MH 822	MH 823	MH 824	MH 825
0	98.3	97.4	93.6	93.5
0.5	97.6	97.1	93.2	92.9
1	98.1	97.0	91.7	92.1
2	97.9	97.6	89.9	92.5
4	97.9	97.5	87.0	93.9
7	98.0	97.5	82.6	92.7
24	97.5	97.3	64.7	90.7
48	97.3	96.4	47.5	87.5

Tabelle 138: Hydrolyse in TRIS bei 37°C

Experiment	Cy5-Oligo	PolyU	MgCl <sub>2</sub>	TRIS	Wasser
MH 862	Primer 18, 1 µl	24 µl	0 µl	20 µl	55 µl
MH 863	Primer 18, 1 µl	0 µl	0 µl	20 µl	79 µl
MH 864	Primer 18, 1 µl	24 µl	20 µl	20 µl	35 µl
MH 865	Primer 18, 1 µl	0 µl	20 µl	20 µl	59 µl
MH 866	Primer 19, 1 µl	24 µl	0 µl	20 µl	55 µl
MH 867	Primer 19, 1 µl	0 µl	0 µl	20 µl	79 µl
MH 868	Primer 19, 1 µl	24 µl	20 µl	20 µl	35 µl
MH 869	Primer 19, 1 µl	0 µl	20 µl	20 µl	59 µl

Tabelle 139: Hydrolyse in TRIS bei 10°C

Experiment	Cy5-Oligo	PolyU	MgCl <sub>2</sub>	TRIS	Wasser
MH 870	Primer 18, 1 µl	24 µl	0 µl	20 µl	55 µl
MH 871	Primer 18, 1 µl	0 µl	0 µl	20 µl	79 µl
MH 872	Primer 18, 1 µl	24 µl	20 µl	20 µl	35 µl
MH 873	Primer 18, 1 µl	0 µl	20 µl	20 µl	59 µl
MH 874	Primer 19, 1 µl	24 µl	0 µl	20 µl	55 µl
MH 875	Primer 19, 1 µl	0 µl	0 µl	20 µl	79 µl
MH 876	Primer 19, 1 µl	24 µl	20 µl	20 µl	35 µl
MH 877	Primer 19, 1 µl	0 µl	20 µl	20 µl	59 µl

Zur Probennahme pipettierte man 1 µl dieser Lösungen in 30 µl Formamid. Sie erfolgte nach 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 12 h, 24, 48 h, 79 h und 141 h.

Nach Integration und erhielt man die folgenden Werte für den Anteil von A12 im Vergleich zum gebildeten A6 in Abhängigkeit von der Zeit.

Tabelle 140: Abnahme A12 in TRIS bei 37°C

Zeit (h)	MH 862	MH 863	MH 864	MH 865	MH 866	MH 867	MH 868	MH 869
0	95.2	95.1	95.2	93.7	95.1	94.8	95.1	93.7
0.5	94.7	94.9	95.1	93.9	95.1	91.5	94.5	91.5
1	95.2	94.9	96.5	92.8	95.0	91.4	94.0	90.9
2	95.3	94.5	95.8	91.8	94.5	93.6	93.2	90.3
4	93.7	93.7	96.6	91.0	94.5	91.1	91.6	89.0
7	94.4	92.1	95.0	90.7	94.3	93.7	88.6	88.0
12	93.0	92.5	95.6	90.1	94.1	93.9	85.2	86.2
24	94.2	92.2	93.2	89.5	93.8	92.3	79.5	83.3
48	93.5	92.4	93.2	85.4	93.2	91.1	64.1	77.6
79	94.1	92.4	92.6	82.3	93.0	90.8	47.5	66.8
141	92.4	91.3	90.3	78.8	92.0	90.3	24.9	60.8

Tabelle 141: Abnahme A12 in TRIS bei 10°C

Zeit (h)	MH 870	MH 871	MH 872	MH 873	MH 874	MH 875	MH 876	MH 877
0	95.2	93.1	95.0	92.8	92.6	92.4	92.3	92.7
0.5	95.0	92.4	94.8	92.5	92.6	92.0	90.1	90.8
1	94.6	92.5	94.4	90.9	91.3	91.1	87.4	88.5
2	94.1	92.1	94.9	90.1	90.7	90.9	86.6	87.0
4	93.4	91.2	95.1	89.2	93.4	90.5	85.5	86.9
7	93.3	91.4	95.4	89.7	93.7	88.2	84.2	86.5
12	93.2	92.7	95.3	88.9	93.1	89.1	83.5	86.1
24	93.1	91.8	95.8	87.4	91.3	90.1	82.7	85.9
48	92.5	92.9	95.6	88.2	93.3	90.5	80.9	85.8
79	94.9	92.3	96.4	88.0	94.8	90.3	78.2	85.6
141	94.6	92.2	96.4	88.0	94.9	90.1	76.3	84.7

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Ac	Acetyl
Acr	Acridin
AMA	Mischung aus Ammoniak/Methylamin
ANA	Anhydrohexitol-Nucleinäure
APS	Ammoniumpersulfat
ber.	berechnet
br.	breit
Bz	Benzoyl
c	cyclo
C	Cytidin
CDI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
CE	Cyanethoxy
COSY	correlated spectroscopy
CPG	controlled pore glass
d	Tag(e), desoxy
D	2,6-Diaminopurin
D	dextro
dam	Dimethylaminomethyliden
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure

---

$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
EDA	Ethylendiamin
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ent.	Enantiomer
eq.	Äquivalent
ESI	Elektronenspray-Ionisierung
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
Exp.	Experiment
FT-IR	Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie
g	Gramm
G	Guanosin
gef.	gefunden
gem.	gemischt
ges.	gesättigt
gly	glyceryl
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(ethylsulfonsäure)
HNA	Hexitol-Nucleinsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
<i>i</i>	iso
isoG	iso-Guanosin
I	Inosin
iBu	isobutyryl
konz.	konzentriert
$\lambda$	Wellenlänge
l	Liter
L	Laevo
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
m	meta



---

M	molar
$\mu\text{M}$	Mikromolar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
max.	maximal
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
2-MeIm	2-Methylimidazol
MeOAc	Essigsäuremethylester
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min.	Minute
ml	Milliliter
$\mu\text{l}$	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMT	Monomethoxytrityl
MP	5'-O-Monophosphat
Mr	relative Molmasse
MS	Massenspektrometrie
mmol	Millimol
$\mu\text{mol}$	Mikromol
nmol	Nanomol
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
OD	optische Dichte
o	ortho
P	Phosphat
p	para
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNA	Peptid-Nucleinsäuren
p-RNA	Pyranosyl-Ribonucleinsäure
r	Ribo

---

R	Rest
rac	racemo
RI	Refraction Index
R <sub>f</sub>	ratio of fronts
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Umkehrphase (reversed phase)
rpm	Umdrehungen pro min.
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
T	Thymin
t	Zeit
t	tert
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBDMS	t-Butyldimethylsilyl
TCA	Trichloressigsäure
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Tri(isopropyl)silyl
TMS	Trimethylsilyl
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TNA	Threose-Nucleinsäure
TOM	Triisopropylsilyloxymethyl
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Trityl	Triphenylmethyl
U	Uridin
Up	5-Propynyluracil
UV	Ultraviolett
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche

## 8.2 Bezifferung der Nucleotide und Farbstoffe

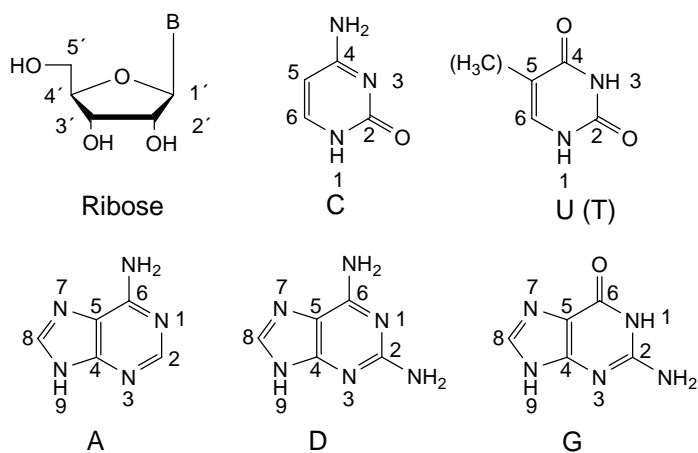


Bild 93: Bezifferung der Ribose und Nucleobasen

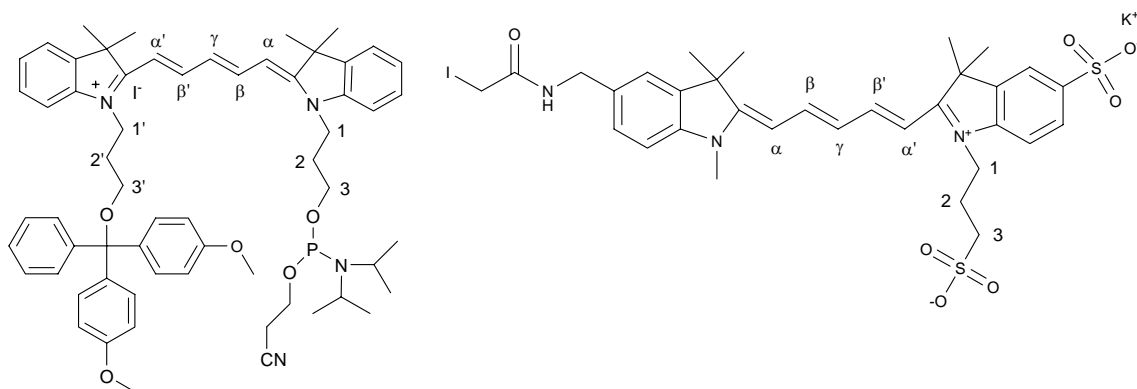


Bild 94: Bezifferung der Cy5-Derivate

### 8.3 Literatur

- [1] „The RNA World“, Ed. R. F. Gestland, J. F. Atkins, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York **1993**
- [2] D. P. Bartel, P. J. Unrau, *Trends Cell Biol.* **1999**, 9, M9.
- [3] G. F. Joyce, *Nature* **2002**, 418, 214.
- [4] M. Yarus, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 260.
- [5] P. Schimmel, S. O. Kelley, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 5.
- [6] T. R. Cech, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 745.
- [7] S. Altmann, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 735.
- [8] D. P. Bartel, J. A. Doudna, N. Usman, J. W. Szostak, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, 11, 3390.
- [9] J. A. Doudna, N. Usman, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1993**, 32, 2111.
- [10] W. K. Johnston, P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner, D. P. Bartel, *Science* **2001**, 292.
- [11] A. J. Hager, J. D. J. Pollard, J. W. Szostak, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 717.
- [12] K. E. McGinness, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 5.
- [13] P. J. Unrau, D. P. Bartel, *Nature* **1998**, 395, 260.
- [14] J. S. Reader, G. F. Joyce, *Nature* **2002**, 420, 841.
- [15] H. F. Noller, V. Hoffarth, L. Zimniak, *Science* **1992**, 256.
- [16] P. A. Lohse, J. W. Szostak, *Nature* **1996**, 381, 442.
- [17] S. L. Miller, *Science* **1953**.
- [18] J. Oro, *Nature* **1961**, 191, 1193.
- [19] A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 218.
- [20] G. F. Joyce, *Nature* **1989**, 338, 217.
- [21] D. Müller, S. Pitsch, A. Kittaka, E. Wagner, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 1410.
- [22] S. Pitsch, S. Wendeborn, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2161.

- 
- [23] M. Boehringer, H. J. Roth, J. Hunziker, M. Goebel, R. Krishnan, A. Giger, B. Schweizer, J. Schreiber, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1416.
- [24] G. Quinkert, E. Egert, C. Griesinger, *Aspekte der Organischen Chemie: Struktur*, Verl. Helvetica Chimica Acta, Weinheim VCH 1995
- [25] J. Hunziker, H. J. Roth, M. Boehringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Goebel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 259.
- [26] K. Groebke, J. Hunziker, W. Fraser, L. Peng, U. Diederichsen, K. Zimmermann, A. Holzner, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 375.
- [27] S. Pitsch, R. Krishnamurthy, M. Bolli, S. Wendeborn, A. Holzner, M. Minton, C. Lesueur, I. Schlönvogt, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 1621.
- [28] M. Bolli, R. Micura, S. Pitsch, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1901.
- [29] R. Rohatagi, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3332.
- [30] R. Rohatagi, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3340.
- [31] Bolli, R. Micura, A. Eschenmoser, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 309.
- [32] K.-U. Schöning, P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Science* **2000**, *290*, 1347.
- [33] P. S. Pallan, C. J. Wilds, Z. Wawrzak, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, M. Egli, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6073.
- [34] L. E. Orgel, *Science* **2000**, *290*, 1306.
- [35] K.-U. Schöning, P. Scholz, X. Wu, S. Guntha, G. Delgado, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4111.
- [36] X. Wu, G. Delgado, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Organ. Lett.* **2002**, *4*, 1283.
- [37] X. Wu, S. Guntha, M. Ferencic, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Organ. Lett.* **2002**, *4*, 1279.

- 
- [38] J. C. Chaput, J. K. Ichida, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*.
- [39] J. C. Chaput, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9274.
- [40] J. P. Ferris, G. Ertem, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12270.
- [41] K. Kawamura, J. P. Ferris, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7564.
- [42] G. Ertem, J. P. Ferris, *Nature* **1996**, *379*, 238.
- [43] J. P. Ferris, A. R. Hill, R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, *381*, 59.
- [44] G. Ertem, J. P. Ferris, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7197.
- [45] G. Ertem, J. P. Ferris, *Ori. of Life and Evol. of the Bios.* **2000**, *30*, 411.
- [46] L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109.
- [47] I. A. Kozlov, L. E. Orgel, *Molecular Biology* **2000**, *34*, 781.
- [48] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 932.
- [49] G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, S. Jordan, M. Mathen, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 456.
- [50] G. von Kiedrowski, J. Helbing, B. Wlotzka, S. Jordan, M. Mathen, T. Achilles, D. Sievers, A. Terfort, B. C. Kahrs, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1992**, *40*, 478.
- [51] D. Sievers, G. von Kiedrowski, *Nature* **1994**, *369*, 221.
- [52] D. Sievers, G. v. Kiedrowski, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 629.
- [53] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nature* **1987**, *327*, 346.
- [54] P.-A. Monnard, A. Kanavarioti, D. W. Deamer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13734.
- [55] T. Li, K. C. Nicolaou, *Nature* **1994**, *369*, 218.
- [56] G. v. Kiedrowski, *Nature* **1996**, *381*, 20.
- [57] J. W. Szostak, D. P. Bartel, P. L. Luisi, *Nature* **2001**, *409*, 387.
- [58] G. F. Joyce, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **1987**, *LII*, 41.
- [59] J. Sulston, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. T. Miles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1968**, *60*, 409.
- [60] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 853.
- [61] R. Lohrmann, P. K. Bridson, L. E. Orgel, *Science* **1980**, *208*, 1464.
- [62] T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7666.
- [63] G. F. Joyce, T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1984**, *176*, 279.

- 
- [64] O. Avededo, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1987**, *197*, 187.
- [65] T. Inoue, L. E. Orgel, *Science* **1983**, *219*, 859.
- [66] L. E. Orgel, *Nature* **1992**, *358*, 203.
- [67] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 317.
- [68] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5496.
- [69] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7963.
- [70] A. R. Hill, L. E. Orgel, T. Wu, *Ori. of Life and Evol. of the Bios.* **1993**, *23*, 285.
- [71] A. Kanavarioti, *Ori. of Life and Evol. of the Bios.* **1994**, *24*, 479.
- [72] A. Kanavarioti, C. F. Bernasconi, E. E. Baird, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8575.
- [73] K. Schütz, M. Kurz, M. W. Göbel, *Tetrahedr. Lett.* **1995**, *36*, 8407.
- [74] K. Schütz, *Dissertation Frankfurt* **1995**.
- [75] M. Kurz, K. Göbel, C. Hartel, M. W. Göbel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 873.
- [76] M. Kurz, K. Göbel, C. Hartel, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 1156.
- [77] M. Kurz, *Dissertation Frankfurt* **1996**.
- [78] M. Zielinski, I. A. Kozlov, L. E. Orgel, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1678.
- [79] C. P. Prakash, C. Roberts, C. Switzer, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1523.
- [80] J. C. Chaput, C. Switzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12866.
- [81] J. C. Chaput, S. Sinha, C. Switzer, *Chem. Commun.* **2002**, *15*, 1568.
- [82] C. Hartel, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2541.
- [83] C. Hartel, *Dissertation Frankfurt* **2000**.
- [84] T. R. Webb, L. E. Orgel, *Nucl. Acids Res.* **1982**, *10*, 4413.
- [85] I. A. Kozlov, L. E. Orgel, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1799.
- [86] C. Böhrer, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578.
- [87] J. G. Schmidt, L. Christensen, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 4792.
- [88] J. G. Schmidt, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 4797.
- [89] J. G. Schmidt, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1494.

- 
- [90] G. F. Joyce, G. M. Visser, C. A. A. van Boeckel, J. H. van Boom, L. E. Orgel, J. van Westrenen, *Nature* **1984**, *310*, 602.
- [91] I. A. Kozlov, S. Pitsch, L. E. Orgel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13448.
- [92] G. F. Joyce, A. W. Schwartz, S. L. Miller, L. E. Orgel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 4398.
- [93] J. C. Chaput, C. Switzer, *J. Mol. Evol.* **2000**, *51*, 464.
- [94] C. Hendrix, H. Rosemeyer, I. Verheggen, F. Seela, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 110.
- [95] H. D. Winter, E. Lescrinier, A. V. Aerschot, P. Herdewijn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5381.
- [96] L. Kerremans, G. Schepers, J. Rozenski, R. Busson, A. V. Aerschot, P. Herdewijn, *Organ. Lett.* **2001**, *3*, 4129.
- [97] R. Declercq, A. V. Aerschot, R. J. Read, P. Herdewijn, L. V. Meervelt, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 928.
- [98] B. Allart, K. Khan, H. Rosemeyer, G. Schepers, C. Hendrix, K. Rothenbacher, F. Seela, A. V. Aerschot, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2424.
- [99] I. A. Kozlov, P. K. Politis, A. van Aerschot, R. Busson, P. Herdewijn, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2653.
- [100] I. A. Kozlov, L. E. Orgel, *Ori. of Life and Evol. of the Bios.* **1999**, *29*, 593.
- [101] I. A. Kozlov, M. Zielinski, B. Allart, L. Kerremans, A. van Aerschot, R. Busson, P. Herdewijn, L. E. Orgel, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 151.
- [102] M. Hey, C. Hartel, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 844.
- [103] H. G. Khorana, *Science* **1979**, *203*, 614.
- [104] N. Usman, K. K. Ogilvie, M.-J. Jiang, R. J. Cedergren, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7845.
- [105] K. K. Ogilvie, N. Usman, K. Nicoghossian, R. J. Cedergren, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5764.
- [106] S. A. Scaringe, C. F. Francklyn, N. Usman, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*, 5433.
- [107] R. Lohrmann, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4188.



- 
- [108] L. J. McBride, R. Kierzek, S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *108*, 2040.
- [109] R. Vinayak, P. Anderson, C. McCollum, A. Hampel, *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 1265.
- [110] M. Smith, D. H. Rammner, I. H. Goldberg, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430.
- [111] K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage, A. L. Schiffman, N. Y. Theriault, K. L. Sadana, *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 2768.
- [112] K. K. Ogilvie, A. L. Schiffman, C. L. Penny, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 2230.
- [113] G. H. Hakimelahi, Z. A. Proba, K. K. Ogilvie, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1106.
- [114] S. J. Jones, C. B. Reese, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1979**, 2762
- [115] C. B. Reese, E. A. Thompson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1988**, 2881
- [116] T. Wu, K. K. Ogilvie, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4717.
- [117] X. Wu, S. Pitsch, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 4315.
- [118] S. Pitsch, P. A. Weiss, X. Wu, D. Ackermann, T. Honegger, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1753.
- [119] D. Gasparutto, D. Molko, R. Téoule, *Nucleosides & Nucleotides* **1990**, *9*, 1087.
- [120] M. P. Reddy, N. B. Hanna, F. Farouqi, *Tetrahedr. Lett.* **1994**, *35*, 4311.
- [121] Y. Hayakawa, R. Kawai, A. Hirata, J.-i. Sugimoto, M. Kataoka, A. Sakakura, M. Hirose, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8165.
- [122] F. Wincott, A. DiRenzo, C. Shaffer, S. Grimm, D. Tracz, C. Workman, D. Sweedler, C. Gonzalez, S. Scaringe, N. Usman, *Nucl. Acids Res.* **1995**, *23*, 2677.
- [123] M. Hey, M. Göbel, 'Nonenzymatic Template Directed RNA Syntheses' in 'DNA Synthesis: Methods and Protocols', 'Methods in Molecular Biology' Series, Ed. P. Herdewijn, Humana Press, Totowa, in Druck
- [124] W. L. Jorgensen, J. Pranata, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2008.
- [125] C. K. Brush, E. D. Anderson, *United States Patent* **1998**, *8,808,044*.
- [126] A. Toutchkine, P. Nalbant, K. M. Hahn, *Biocon. Chem.* **2002**, *13*, 387.

- [127] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, A. S. Waggoner, *Biocon. Chem.* **1993**, 4, 105.
- [128] D. J. Gale, J. F. K. Wilshire *J. Soc. Dyers Colours* **1974**, 90, 97.
- [129] B. Zhang, Z. Cui, L. Sun, *Organ. Lett.* **2001**, 3, 275.
- [130] D. A. Usher, A. H. McHale, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 1149.
- [131] M. Hey, *Diplomarbeit Frankfurt* **1999**.

## 8.4 Index

2',5'-Verknüpfung	Seiten 22-23, 29, 35, 103
<b>A</b>	
A-Form/Konformation	Seiten 35, 41-42, 58, 67, 74-75
Acridin	Seiten 18-19, 37, 53
Aminosäure	Seite 17
ANA	Seiten 26-28
<b>C</b>	
Cy5	Seiten 28, 37, 84-85, 87, 89-90, 92, 182-188, 199, 201, 203
Cyclophosphat	Seiten 9-10
<b>D</b>	
Diaminopurin	Seiten 7, 21, 33, 38, 97, 139-159, 169-172, 201
<b>F</b>	
Fehleinbau	Seiten 18, 21, 24, 27, 45, 47, 52, 59, 66, 81
Festphasensynthese	Seiten 31, 33-34, 84, 87, 199, 203
Fluoreszenz	Seiten 18-19, 28, 37, 84, 98-99, 204
<b>G</b>	
G-Tetraden	Seiten 32, 58, 61, 66
GMPS, GSMP	Seite 87-89
<b>H</b>	
Hairpin	Seiten 16-17, 21, 25
HNA	Seiten 41-43
HOMO-DNA	Seiten 18-20

---

Hoogsteen	Seiten 7, 13
Hydrolyse	Seiten 35, 100, 103, 106-112, 278-280
<b>I</b>	
Iodacetamid	Seiten 84-85, 87, 89, 188
<b>K</b>	
Kreuzinhibierung	Seiten 46, 77-78, 80-81, 85, 88, 95
kritische Länge	Seiten 38-42, 44, 48, 95
<b>L</b>	
Ligation	Seiten 9-13
Linker	Seiten 28-30, 34, 37-38, 55-56, 89
<b>O</b>	
orthogonal	Seite 44-45, 51, 75-78, 80, 82, 85-86, 91, 93-94, 96
<b>P</b>	
PCR	Seiten 21, 75-77, 80, 85, 91, 96-99, 277
Phosphoramidit	Seiten 28, 31-33, 84-85, 102, 112-113, 121-122, 132, 137, 139, 151, 182, 187, 199, 200
PNA	Seiten 38-39
p-RNA	Seiten 18-22
präbiotisch	Seite 15, 17-18, 23-24, 29, 41
<b>R</b>	
random	Seiten 51-53, 55, 57, 58-60, 65-66, 68-69, 71, 80, 83, 94-95, 228, 236, 241, 250, 254, 256
Ribose	Seite 18, 20
Ribozyme	Seite 13, 15-16
RNA-Welt	Seite 15-17, 20, 25, 29
Rückreaktion, siehe PCR	
<b>S</b>	
Sekundärstruktur	Seiten 15, 30, 32, 62
Selbstreplikation	Seiten 2, 12-14
Sequencer	Seiten 28, 38, 70, 100, 207
stacking, sie Stapelwechselwirkung	
Stammlösung	Seiten 118, 220, 224-225, 279

Stapelwechselwirkung	Seiten 9, 17, 22, 42, 44-46, 48, 50, 95-96
<b>T</b>	
TNA	Seiten 10-11
Wasserstoffbrücken	Seiten 18, 21-22, 42, 47-48, 50, 66, 95-96
Watson-Crick	Seiten 9, 14, 23, 36, 45, 59
Wobble	Seiten 18, 24, 27, 45, 47, 59, 94
<b>Z</b>	
Zufallsposition, -sequenz, sie random	

## 8.5 Bildverzeichnis

Bild 1: Mögliche Bildung der Purin-Basen aus Blausäure und Dicyan [19]	4
Bild 2: Formose-Reaktion nach [20]	5
Bild 3: Glycoaldehyd-phosphat <u>1</u> und Ribose-2,4-diphosphat <u>2</u> [21]	6
Bild 4: Homo-DNA (links) und p-RNA (rechts)	7
Bild 5: einige Basenpaarungen bei Homo-DNA [26]	8
Bild 6: Chemische Ligation über ein Cyclophosphat	9
Bild 7: Bildung längerer Oligomere aus Tetrameren	10
Bild 8: TNA (links) und TNA mit Phosphoramidat-Brücke	10
Bild 9: Nucleosid-5'-phosphorimidazolid	11
Bild 10: Selbstreplizierendes Hexanucleotid	12
Bild 11: Guanosin-2-Methyl-Phosphorimidazolid 2-MeImpG <u>3</u>	15
Bild 12: Die Kettenverlängerung mit 2-MeImpG verläuft von 5' in 3'-Richtung	15
Bild 13: Hairpin-System nach Orgel	16
Bild 14: G-Tetraden mit einem Alkali-Kation als Zentralion	17
Bild 15: A/U- (links) und G/U-Wobble-Paar (rechts)	18
Bild 16: Testsystem nach Göbel [75]	19
Bild 17: Struktur des verwendeten Acridin-Phosphoramidits <u>4</u>	19
Bild 18: G/C- (oben) A/T- (unten links) und D/T-Basenpaar (unten rechts)	20
Bild 19: isoG/isoC- (links) und Up/D Basenpaar (rechts)	21
Bild 20: I/C Basenpaar (links) und mögliches A/I-Basenpaar (rechts)	22
Bild 21: Strukturen von RNA (links) und PNA (rechts) im Vergleich	23

Bild 22: Strukturen von 2-MeImpG <sub>D</sub> <b>3</b> und 2-MeImpG <sub>L</sub> <b>ent-3</b>	24
Bild 23: Acyclische Glycerol Nucleinsäure nach Switzer [93]	25
Bild 24: Strukturen von HNA (links) und ANA (rechts)	26
Bild 25: Primer aus [83]	27
Bild 26: Strukturformel des verwendeten Cy5 –Phosphoramidits <b>5</b>	28
Bild 27: Orthogonales Primerpaar zum Experiment aus Bild 28	28
Bild 28: Orthogonale Oligomerisierungsreaktionen aus [83]	29
Bild 29: Kreuzinhibierung bei dem „CCUCC“ Homopyrimidin-Primer aus Bild 27 durch zusätzliche Imidazole	30
Bild 30: Syntheszyklus der Phosphoramidit-Festphasensynthese	31
Bild 31: Derivatisierung der Nucleoside für die Phosphoramidit Methode am Beispiel von Guanosin <b>6</b>	32
Bild 32: Testsystem nach Göbel mit Acridin gelabelten Primern	36
Bild 33: Cy5 markierter Primer nach Hartel, ein Analog zum bewährten „GCACG“ Primer	36
Bild 34: Kritische Länge des Templats	38
Bild 35: Inkubation mit Primer 14 und dem „8C“-Templat 29 mit Na- Imidazoliden (oben) oder Li-Imidazoliden (unten)	39
Bild 36: Inkubation mit Primer 14 und dem „8G“ Templat 62 und Na- Imidazoliden (oben) oder Li-Imidazoliden (unten)	42
Bild 37: Einbau von G und C an Primer 14 und mit Templat 47	44
Bild 38: Einbau von G und C an Primer 14 und mit Templat 75	45
Bild 39: Inkubation am Templat 19 und Primer 14	46
Bild 40: Vergleich G/C- mit D/T-Basenpaar, die dicken gestrichelten Linien bezeichnen die negativen sekundären Wechselwirkung, die dünnen gestrichelten Linien bezeichnen die positiven sekundären Wechselwirkungen.	48
Bild 41: Einbau von G und D am Templat 92 mit Primer 14	48
Bild 42: Einbau von 2-MeImpU und 2-MeImpG an den Templat 89 und Templat 95	49
Bild 43: Zufallseinbau an [C/T] mit Primer 14 und Templat 53	50

Bild 44: Einbau an der Zufallsposition [A/C/G/T] mit Primer 14 und Templat 54	51
Bild 45: Templat 79 mit vier Zufallspositionen aus A/C/G/T mit Primer 14	52
Bild 46: Schema eines nichtenzymatischen PCR Experiments nach Hartel	53
Bild 47: Orthogonale Homopyrimidin-Primer (Primer 15 und Primer 16)	54
Bild 48: Aufbau der gegenseitigen Primerbindesequenz (Primer 15 mit Templat 50, oben, und Primer 16 mit Templat 51 unten)	54
Bild 49: Einbau von G an Primer 15 mit Templat 18	57
Bild 50: Beispiel für ein Selektionsexperiment	57
Bild 51: Einbau an Zufallssequenzen C/T mit Primer 15 und Templat 67	58
Bild 52: Einbau an Zufallssequenzen aus A/C/G/T mit Primer 15 und Templat 71	59
Bild 53: Einbau von G an Primer 16 mit Templat 60	60
Bild 54: Einbau von G, D/A oder G/D an Primer 16 mit Templat 51	60
Bild 55: Einbau von G an Primer 13 und Templat 17	61
Bild 56: Einbau von G und D an Primer 13 mit Templat 13	62
Bild 57: Einbau von G und D an Primer 13 mit Templat 14	62
Bild 58: Einbau von G und C an Primer 12 mit Templat 15	63
Bild 59: Einbau von G und D an Primer 12 und Templat 9	64
Bild 60: Einbau von G und G/D an Zufallspositionen an Primer 12 und Templat 69	64
Bild 61: Einbau an Primer 12 und Templat 73	66
Bild 62: Einbau von G an Primer 17 und Templat 24	66
Bild 63: Einbau G und D an Primer 17 und Templat 21	67
Bild 64: Zufallssequenzen in Templat 85, Einbau an Primer 17	68
Bild 65: Inkubation an der Zufallsposition aus A/C/G/T mit Primer 17 und Templat 86	68
Bild 66: Einbau von G an Primer 21 mit Templat 18	70
Bild 67: Inkubation mit 2-MeImpG und 2-MeImpD mit Primer 21 und Templat 67	70
Bild 68: Verlängerung von Primer 12 bei Anwesenheit von Primer 13 und Templat 11	71

---

Bild 69: Verlängerung von Primer 13 bei Anwesenheit vom Primer 12 und Templat 12	71
Bild 70: Verlängerung von beiden Primern 12 und 13 bei Anwesenheit von beiden Templaten 11 und 12	72
Bild 71: Die Template 9 und 18 haben eine komplementäre Sequenz	72
Bild 72: Verlängerung von Primer 12 bei Anwesenheit von Primer 15 und Templat 9	73
Bild 73: Verlängerung von Primer 15 bei Anwesenheit von Primer 12 und Templat 18	74
Bild 74: Primer 15 vor der Reaktion (oben), das vollverlängerte Rohprodukt (Mitte) und der aufgereinigte vollverlängerte Primer (unten)	75
Bild 75: Rückreaktion mit Primer 21 am verlängerten und aufgereinigten Primer 12 als Templat nach 7 Tagen	76
Bild 76: Rückreaktion mit Primer 12 am verlängerten und aufgereinigten Primer 21 als Templat nach 7 Tagen	77
Bild 77: Schema für die HPLC Analyse eines Verlängerungsprodukts (Primer DNA, Templat und Monomere RNA)	78
Bild 78: HPLC-Analyse der Hydrolyseprodukte nach Inkubation mit 2- MeImpG und 2-MeImpD, Verhältnis von G zu D von 5.6:1 (Primer aus DNA, Templat aus RNA)	80
Bild 79: HPLC-Analyse der Hydrolyseprodukte nach Inkubation mit 2- MeImpG und 2-MeImpD, Verhältnis von G zu D von 2.6:1 (Primer aus DNA, Templat aus RNA)	81
Bild 80: Experiment zur Analyse des Zufallseinbaus nach Inkubation mit 2- MeImpC, 2-MeImpG, 2-MeImpU und 2-MeImpD, Primer aus DNA, Templat aus RNA	82
Bild 81: Synthese des Cy5 Phosphoramidits <b>15</b>	84
Bild 82: Synthese Indol-Chloracetamid <b>20</b>	85
Bild 83: Synthese des Kopplungsbausteins <b>28</b>	85
Bild 84: Synthese des Cy5 Iodacetamids <b>30</b>	86
Bild 85: Synthese von GSMP <b>31</b>	87
Bild 86: Synthese von GMPS <b>36</b>	88

Bild 87: Hydrolyse von A <sub>12</sub> bei 37°C in EDA im Vergleich zu entstehenden 6mer	89
Bild 88: Hydrolyse von A <sub>12</sub> bei 10°C in EDA im Vergleich zu entstandenem 6mer	89
Bild 89: Abnahme A <sub>12</sub> in TRIS Puffer bei 37°C, Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 2	91
Bild 90: Abnahme A <sub>12</sub> in TRIS Puffer bei 10°C, Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 3	92
Bild 91: HPLC-Analyse der sechs Nucleoside Cytidin, Uridin, Guanosin, iso- Guanosin, Diaminopurin und Adenosin	96
Bild 92: Beispiele für Purin/Purin-Basenpaare	96
Bild 93: Bezifferung der Ribose und Nucleobasen	264
Bild 94: Bezifferung der Cy5-Derivate	264

## 8.6 Registriernummernverzeichnis

<b>3</b>	151265-52-0	<b>6</b>	118-00-3
<b>7</b>	628-09-1	<b>8</b>	62116-24-9
<b>9</b>	1640-39-7	<b>10</b>	182873-70-7
<b>11</b>	122-31-6	<b>12</b>	212563-51-3
<b>13</b>	182873-72-9	<b>16</b>	118-12-7
<b>18</b>	62783-90-8	<b>19</b>	62783-91-9
<b>20</b>	62783-92-0	<b>21</b>	90829-70-2
<b>22</b>	563-80-4	<b>23</b>	132557-72-3
<b>24</b>	184351-56-2	<b>25</b>	1120-71-4
<b>26</b>	427882-78-8	<b>27</b>	5652-79-9
<b>28</b>	427882-80-2	<b>29</b>	427882-83-5
<b>30</b>	427882-84-6	<b>31</b>	374925-79-8
<b>32</b>	362-79-5	<b>33</b>	48196-25-4
<b>34</b>	68200-62-4	<b>35</b>	68200-68-0
<b>36</b>	231936-43-9	<b>37</b>	58-61-7
<b>38</b>	2096-10-8	<b>39</b>	6979-94-8



---

<b>40</b>	16321-99-6	<b>41</b>	79999-42-1
<b>42</b>	52921-40-1	<b>45</b>	104992-55-4
<b>46</b>	104992-55-4	<b>47</b>	65-46-3
<b>48</b>	3768-18-1	<b>49</b>	121058-82-0
<b>50</b>	121058-85-3	<b>51</b>	123956-65-0
<b>54</b>	7561-54-8	<b>56</b>	17331-16-7
<b>57</b>	126922-60-9	<b>58</b>	159217-66-0
<b>59</b>	177978-41-5	<b>61</b>	159217-66-0
<b>66</b>	76101-30-9	<b>67</b>	81246-80-2
<b>68</b>	81246-81-3	<b>69</b>	118362-03-1
<b>70</b>	131349-34-3	<b>75</b>	4546-55-8
<b>71</b>	81246-82-4	<b>72</b>	81265-93-2
<b>73</b>	81256-88-4	<b>74</b>	160513-05-3
<b>76</b>	159639-71-1	<b>77</b>	104992-55-4
<b>78</b>	159639-72-2	<b>82</b>	56824-33-0
<b>83</b>	BRN 6544018	<b>84</b>	BRN 6557975
<b>87</b>	159217-70-6	<b>88</b>	61-19-8
<b>89</b>	31008-65-8	<b>90</b>	210102-22-0
<b>91</b>	85179-51-7	<b>92</b>	58-96-8
<b>93</b>	58-97-9	<b>94</b>	BRN 8445757
<b>95</b>	BRN 7442296	<b>96</b>	7561-54-8
<b>98</b>	1818-71-9	<b>99</b>	BRN 7312401
<b>102</b>	7719-12-2	<b>103</b>	81246-79-9
<b>104</b>	89992-70-1		

## Lebenslauf

geboren am 08.07.1973 in Frankfurt am Main, ledig, keine Kinder

### Schul Ausbildung

1980–1984	Eschersheimer Grundschule in Frankfurt am Main
1984–1993	Ziehenschule in Frankfurt, Abschluss Abitur am 14.6.1993 mit der Note 2.2

### Zivildienst

1993–1994	evangelische Gemeinde Bonames in Frankfurt am Main
-----------	--

### Universitätsausbildung

1994-1999	Studium des Fachs Chemie mit Abschluss Diplom an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main Diplomchemiker-Vorexamen am 1.10.1996 mit der Note 1.5 Diplomchemiker-Hauptexamen am 22.12.1998 mit der Gesamtnote 1.1
Jan. – Sept. 1999	Diplomarbeit „Matrizengesteuerte Oligomerisierung von Adenosin an Poly-Uridylsäure“ im Arbeitskreis von Prof. Göbel an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
1999-2004	Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. W. Göbel an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

## Publikationsliste

- M. Hey, M. Göbel „Nonenzymatic Oligomerization of Ribonucleotides: Achievements and Limitations“ *Vortrag bei 1<sup>st</sup> Workshop of the COST Chemistry Action D 27, Ravello, Italien, 17.-20. 10. 2002*
- M. Hey, C. Hartel, M. Göbel „Nonenzymatic Oligomerization of Ribonucleotides: Towards in vitro Selection Experiments.“ *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 844.
- S. Pitsch, U. Scheffer, M. Hey, A. Strick, M. Göbel „On Facts and Artefacts: The Difficulty to Evaluate an Artificial Nuclease“ *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 3740.
- M. Hey, M. Göbel, „Nonenzymatic Template Directed RNA Syntheses“ in „DNA Synthesis: Methods and Protocols.“ *Methods in Molecular Biology*, Ed. P. Herdewijn, Humana Press, Totowa, in Druck

---

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Mit der Nichtenzymatischen Templatgesteuerten Oligomerisierung von RNA zu Selektionsexperimenten“ selbständig angefertigt, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

